

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARLA FRANCISCA DUARTE CAMPOS

TRATAMENTO SUPRESSIVO COM MONEPANTEL SOBRE A SELEÇÃO
FENOTÍPICA EM OVELHAS NATURALMENTE INFECTADAS EM PASTAGENS

CURITIBA

2018

KARLA FRANCISCA DUARTE CAMPOS

TRATAMENTO SUPRESSIVO COM MONEPANTEL SOBRE A SELEÇÃO
FENOTÍPICA EM OVELHAS NATURALMENTE INFECTADAS EM PASTAGENS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Alda Lúcia Gomes Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA

2018

C198t Campos, Karla Francisca Duarte
Tratamento supressivo com monepantel sobre a seleção
fenotípica em ovelhas naturalmente infectadas em pastagens /
Karla Francisca Duarte Campos. - Curitiba, 2018.
61 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia.

Orientadora: Alda Lúcia Gomes Monteiro
Coorientador: Marcelo Beltrão Molento

1. Ovino - Criação. 2. Ovino - Doenças. 3. Pastagens. 4.
Ovino - Genética. I. Monteiro, Alda Lúcia Gomes. II. Molento,
Marcelo Beltrão. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.32/.38



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KARLA FRANCISCA DUARTE CAMPOS** intitulada: **Tratamento supressivo com monepantel sobre a seleção fenotípica em ovelhas naturalmente infectadas em pastagens**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Abril de 2018.

ALDA LUCIA GOMES MONTEIRO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARIA ANGELA MACHADO FERNANDES
Avaliador Externo (UFPR)

JORDANA ANDRIOLI SALGADO
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter estado comigo mesmo quando pensei que estava sozinha e por ter segurado minhas mãos nos momentos mais difíceis que vivi.

À minha Mãe e fonte de inspiração, Tereza Duarte, por ser meu exemplo de força, garra, Fé e determinação. Sou pela senhora e para a senhora todos os dias da minha vida. Lhe amo em tudo e por tudo. Obrigada por todas as orações e por ser tão presente, mesmo estando longe de mim fisicamente.

Ao meu irmão e maior incentivador, Pedro Duarte. Obrigada pelos conselhos e conversas tão oportunos. Obrigada pelas palavras de incentivo e por me dar coragem para permanecer e continuar. Obrigada pela Melissa e pelo Pedrinho. Vocês me enchem de amor e de vontade de vencer. Amo vocês em todos os momentos.

Às minhas Tias: Mainha, Vanda e Naíde, por serem tão amadas e por me encherem de carinho a cada ligação ou a cada reencontro em casa.

Aos meus Tios: Alcione, Santos e Jorge, pelo fundamental apoio para que eu pudesse concluir essa etapa tão importante da minha vida.

Aos meus primos e demais familiares, por fazerem meus dias de férias em Manaus sempre felizes, por me proporcionarem ótimos momentos e belíssimas lembranças. Vocês são parte de mim. Obrigada por tudo.

À minha cunhada, Suene, por sempre estar disposta a me ouvir, fosse para me acalmar, me aconselhar ou simplesmente me deixar diminuir a saudade dos meus sobrinhos através de uma chamada de vídeo.

Ao meu amigo e esteio durante o ano mais desafiador da minha vida, Téo Melo. Obrigada por me ajudar a passar por todas as dificuldades sempre com um sorriso no rosto. Você teve um papel fundamental para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos de Manaus por me levarem para perto de casa através de conversas e ligações. Vocês fizeram muitos dos meus dias mais leves com nossos bate-papos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alda Monteiro, por ter confiado no meu trabalho e ter me dado a oportunidade de aprender e crescer profissionalmente dentro do LAPOC. Agradeço os momentos onde pude absorver um pouco dos seus conhecimentos, mas também sou grata pelas broncas e duras. Certa vez lhe disse que somos um pouco de cada pessoa que cruza nossas vidas, por isso tenho muita

gratidão por hoje levar um pouco da senhora comigo. Obrigada por tudo, Professora. Sua participação foi importante e fundamental para que esse trabalho pudesse ser executado e finalizado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Molento, por todos os conhecimentos compartilhados e por ter sido indiretamente responsável pela decisão de continuar em Curitiba e concluir o mestrado. Ouvir do senhor o quanto foi difícil estar longe quando fizestes a pós-graduação, mas que o resultado de tudo era extremamente satisfatório me ajudou a enxergar que a dificuldade enaltece a vitória caso não desistamos. E, na mesma ocasião, antes de sair da sua sala fui indagada sobre o pensamento da minha Mãe a respeito de eu estar aqui e então o senhor me disse para tirar forças disso. Naquele dia saí da sua sala com a certeza que eu deveria continuar e seguir até o final. Obrigada, Professor.

Aos integrantes do Team LAPOC nos anos de 2016 e 2017, por dividir momentos de muito trabalho, mas também de muita diversão e comilança. Cresci muito ao lado de todos vocês. Fui muito feliz e sou imensuravelmente grata a todos: Aline, Fernanda, Júlia M, Nicole T, Paula, Alexandre, Bruna, Daiane, Mary Clara, Vanessa Knopp, Jaque, Karina, Elísio e Wagner.

À minha amiga, Mylena Peres, por dividir momentos importantíssimos comigo e por me dar forças na dura caminhada que percorremos juntas durante o mestrado. Obrigada por todos os presentes, todos os conselhos, todas as conversas, todos os memes em redes sociais e todas as gordices que fizemos juntas. Te amo, Polaca da mana! Você tornou meus dias mais prazerosos e felizes. Estou e permanecerei contigo sempre.

À pessoa que aprendi a amar e admirar, Ana Carolina, por ser uma excelente amiga, parceira de lida e profissional. Aprendi muito contigo e levo todos os momentos que dividimos em meu coração. Obrigada por compartilhar tantas coisas comigo, fossem boas ou ruins. Saiba que podes contar comigo sempre que precisar. Sou muito grata por tudo. Amo você, Agna. Muito!

À pessoa mais feliz às 8h da manhã que conheci na vida, Laura Faísca, por me contagiar com sua tão espontânea alegria matinal, mas principalmente por sempre ter as palavras certas nos momentos certos. Obrigada por todo o apoio, Laurínea. Até quando eu não acreditava em mim. Amo você!

Ao ser humano mais teimoso que conheci, Rafael Batista, por ter me ajudado em muitos momentos, por esclarecer dúvidas, dividir angústias, conversar

aleatoriamente para esquecer todo o estresse, comer bastante e compartilhar os melhores gifs da internet. Não posso deixar de te agradecer por toda a ajuda com a minha amiga tecnologia. Rafildo, tu é demais. Você mora no meu coração e trago comigo ótimas lembranças em que tu estás presente. Conte comigo sempre! Amo-te.

À pessoa que está sempre disposta a ajudar quem precisa, Tehane Twardowski. Obrigada por toda ajuda no âmbito profissional ou pessoal. Estarei aqui sempre que você precisar. Das gratas surpresas que Deus manda para a minha vida, você é uma delas. Amo você, nêga.

À pessoa que me conhece de outras vidas e torna essa vida mais alegre e leve, Rafaela Kormann. Obrigada por ser quem és e por tudo o que partilhamos juntas. Você mora no meu coração e te levarei comigo sempre. Te amo, imensa!

Ao meu irmão Polaco, Ricardo Wilczek, por ter cruzado meu caminho no início de tudo e a partir de então ter contribuído para que tudo fosse mais divertido. Obrigada por sempre me ouvir, me ajudar, me entender e se fazer presente. Te amo demais e torço muito por ti. Estou e permanecerei aqui sempre que precisares.

Aos amigos que fiz no LAPOC, ou até antes disso, e que irão comigo por toda a vida: André, por todas as alturas de pastagem, conversas e ótimos conselhos; Bhedlyn, por todas as zoações, mas também pela parceria em momentos difíceis e, principalmente, por aceitar meus exageros; Gabi, por me ouvir e por me dar forças; Vanessa Chek, por ter feito tanto e por dividir comigo momentos mais que especiais; Livia, por ser tão parecida comigo e por isso conseguir me entender e dizer exatamente o que preciso ouvir. Amo vocês! Obrigada por tudo.

Aos amados amigos do LDP por tantas conversas boas e ótimos momentos: Andréia, Bruno, Carla, Izanara, Lucas, Luciana e Úrsula.

Ao Prof. Dr. Amilcar Arenal, por todo o conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Laila Talarico e à Bárbara Nascimento, pela fundamental ajuda com a tão adorada estatística.

Aos funcionários do LAPOC que tiveram fundamental colaboração para que essa pesquisa ocorresse: Seu Lazineho, Seu Luís, Sérgio, Júlio, Daniel e Polaco.

À todos os amigos que fiz nesses dois anos em que frequentei a Universidade Federal do Paraná e que me fizeram sorrir em algum momento, mostrando que a vida é difícil, mas com amigos se torna feliz e repleta de momentos únicos.

RESUMO

O controle de parasitas gastrintestinais têm se mostrado um grande desafio para a ovinocultura no Brasil, devido ao fenômeno da resistência aos medicamentos anti-parasitários. O fenômeno da resistência é a redução da eficácia do medicamento inferior a 95%. A fim de estudar a resposta ao uso do princípio ativo monepantel (MNT) em tratamento supressivo de ovinos em pastagens, foram utilizadas 45 ovelhas mestiças Suffolk e White Dorper, naturalmente infectadas com nematódeos gastrintestinais (NGI) no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC) da Universidade Federal do Paraná. As ovelhas foram divididas em três grupos de 15 animais, sendo; G1: Controle; sob tratamento após avaliação do grau FAMACHA® (FMC) a cada 15 dias, G2: Monepantel (MNT) na dose terapêutica de 20 mg/kg, independentemente do grau FMC; e G3: MNT na dose de 40 mg/kg, independentemente do grau FMC. Para os grupos 2 e 3 os animais receberam as doses do medicamento via oral, conforme a recomendação do fabricante, a cada 30 dias. A cada 15 dias todos os animais do experimento foram pesados e tinham seu grau FMC e escore de condição corporal monitorados, além do sangue coletado para determinação do hematócrito a cada 30 dias; nesse intervalo também ocorriam as avaliações de pastagem, altura e massa de forragem – na qual os animais foram mantidos. As contagens de larvas infectantes (L3) na pastagem ocorreram mensalmente. A eficácia do MNT foi avaliada nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 de cada mês, através de coleta de fezes semanal para contagem de ovos por grama de fezes (OPG), sendo reiniciada a avaliação a partir da aplicação do medicamento no dia 0 do mês subsequente, totalizando seis meses. A cada 30 dias foi feita coprocultura com a amostra fecal composta de todos os animais para identificação das espécies de parasitas. Não houve efeito de tratamento ($P>0,05$) sobre o número de OPG nas fezes das ovelhas e nem sobre a variável peso ($P=0,75$). No entanto, sobre esta variável houve efeito de período ($P<0,0001$) e interação tratamento x período ($P<0,0001$). Os valores de grau FMC variaram entre os graus 1 e 2. As médias de hematócrito foram 27, 29 e 32%, respectivamente, para os grupos Controle, G2 e G3. Concluiu-se que, após a utilização do MNT de maneira supressiva, a baixa eficácia observada (28 e 39% para os grupos 2 e 3, respectivamente) pode ser indicativo de resistência parasitária.

Palavras-chave: Alteração fenotípica, Monepantel, OPG, ovinocultura, resistência

ABSTRACT

The control of intestinal parasites has been demonstrated a big challenge for the sheep farming in Brazil as a result of the resistance of the nematodes to anti-parasitic. The phenomenon of the resistance is a significant reduction in 95% on efficacy of the medicine. To study an answer the use of the active monepantel (MNT) in suppressor treatment of sheep in pasturage, 45 sheep Suffolk and White Dorper sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes (GIN) were used in the Sheep Research and Production Laboratory (LAPOC) of the Federal University of Paraná (UFPR). The sheep were divided into three groups of 15 animals, being; G1: Control; with treatment after evaluated the degree FAMACHA (FMC) every 15 days, G2: Monepantel (MNT) at a dose of 20 mg / kg (therapeutic dose), regardless of the degree of FMC; and G3: MNT at a dose of 40 mg / kg, regardless of the degree of FMC. For groups 2 and 3, the animals received doses of oral medication, according to the manufacturer's recommendation, every 30 days. Every 15 days all animals in the experiment were weighed and had their FMC grade and body condition score monitored, in addition to the blood collected for hematocrit determination every 30 days; in this interval also the evaluations of pasturage, height and forage mass occurred - in which the animals were maintained. The counts of infective larvae (L3) on pasturage occurred monthly. The effect of MNT was evaluated on days 0, 7, 14, 21 and 28 of each month, through weekly stool collection for egg count per gram of feces (EPG), and the evaluation was restarted from the application of the drug, on day 0 of the subsequent month, totaling six months. It was done coproculture with the fecal sample composed of all the animals to identify the species of parasites, every 30 days. There was no treatment effect ($P > 0.05$) on the number of EPG in the faeces of the ewes and neither about the weight variable ($P = 0.75$). However, on this variable there was period effect ($P < 0.0001$) and treatment x period interaction ($P < 0.0001$). The values of FMC degree ranged between grades 1 to 2. The mean hematocrit values were 27, 29 and 32%, respectively, for the Control, G2 and G3 groups. It was concluded that, after MNT suppressive use, the observed low efficacy (28 and 39%) for groups 2 and 3, respectively may be indicative of parasitic resistance.

Key-words: Phenotypic alteration, Monepantel, EPG, sheep farming, resistance

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE ATIVIDADES EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS	30
FIGURA 2 - DOSAGEM PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS	31
FIGURA 3 - ÁREA EXPERIMENTAL E SIMULAÇÃO DE ROTAÇÃO ENTRE PIQUETES PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	32
FIGURA 4 - ETAPAS DA LAVAGEM DE PASTO PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS	33
FIGURA 5 - COLETA DE FEZES, PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	35
FIGURA 6 - PROCEDIMENTOS PARA DOSAGEM DO MONEPANTEL E AVALIAÇÃO DO GRAU FMC PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	37
FIGURA 7 - EFICÁCIA DO MONEPANTEL CONSIDERANDO A CONTAGEM DE OPG EM OVELHAS MISTIÇAS SUFFOLK X WHITE DORPER NO 7º DIA PÓS-TRATAMENTO DE CADA MÊS, PARA AS DOSES 20 E 40 MG/kg PC	38
FIGURA 8 - PESO DOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	41
FIGURA 9 - ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL DOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	41

FIGURA 10 - MÉDIA DE GRAU FAMACHA® EM OVINOS NO 7º DIA PÓS-TRATAMENTO DE CADA MÊS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS	43
FIGURA 11 - MÉDIA DE OPG EM OVINOS NO 7º DIA PÓS-TRATAMENTO DE CADA MÊS, PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	44
FIGURA 12 - NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES (L3) RECUPERADAS NOS MESES DE AVALIAÇÕES NOS DIFERENTES PIQUETES EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS.....	46
FIGURA 13 - TEMPERATURA (°C) E PLUVIOSIDADE MÉDIA DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉDIA NOS SEIS MESES DE AVALIAÇÕES DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES RECUPERADAS NA PASTAGEM, ALTURA DE PASTAGEM E MASSA DE FORRAGEM PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS	47
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 OVINOS E INFECÇÕES PARASITÁRIAS	17
3.2 PRINCIPAIS MEDICAMENTOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DE OVINOS.....	18
3.3 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM OVINOS	19
3.4 MECANISMO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	21
3.5 MONEPANTEL: UMA NOVA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA	22
3.6 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AO MONEPANTEL.....	23
3.7 MANEJO DE PASTAGEM COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE PARASITOSE EM OVINOS.....	24
3.8 TESTES PARA DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA PARASITÁRIA	25
3.9 TESTES FENOTÍPICOS: MODELOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	26
3.9.1 Teste <i>In Vitro</i>	26
3.9.1.1 Teste de Eclosão de Ovos (TEO).....	26
3.9.1.2 Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL).....	27
3.9.1.3 Teste de Migração Larvar (TML)	27
3.9.2 Teste <i>In Vivo</i>	27
3.9.2.1 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF).....	28
3.9.2.2 Teste controlado de eficácia.....	28
3.10 TESTE GENOTÍPICO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30

4.1 LOCAL.....	30
4.2 TRATAMENTOS, MANEJO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
4.3 AVALIAÇÕES REALIZADAS NA PASTAGEM.....	32
4.3.1 Contagem e Identificação de Larvas Infectantes (L3) Presentes na Pastagem	32
4.3.2 Altura da Pastagem	33
4.3.3. Disponibilidade da Massa de Forragem	34
4.4 AVALIAÇÕES REALIZADAS NOS ANIMAIS	34
4.4.1 Contagem do Número de Ovos por Grama de Fezes (OPG).....	34
4.4.2. Teste de Redução de Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF).....	35
4.4.3 Coprocultura.....	35
4.4.4. Pesagem, Avaliação do Grau FAMACHA© (FMC) e do Escore de Condição Corporal	36
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 EFICÁCIA DO MONEPANTEL.....	38
5.2 PESO	40
5.3 FAMACHA©	42
5.4 VALORES DE OPG	43
5.5. CONTAGEM DE LARVAS INFECTANTES (L3) NA PASTAGEM.....	45
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por nematódeos gastrintestinais (NGI) são um desafio na produção animal, podendo gerar impacto econômico negativo considerável para a agroindústria. Fatores como ganho de peso inadequado, morte de cordeiros e baixo desempenho reprodutivo podem ser observados em ovinos acometidos por esses parasitas.

O controle das parasitoses é baseado principalmente no tratamento dos animais com medicamentos anti-helmínticos, na maioria dos rebanhos comerciais. No entanto, a resistência dos parasitas aos grupos de medicamentos comercializados em todo o mundo (ex. benzimidazóis, lactonas macrocíclicas, entre outros) reduz a eficiência desejada para os mesmos, prejudicando os programas de controle parasitário. Essa grave situação impõe desafios para a ovinocultura do Brasil e de todo o mundo.

O controle de infecções parasitárias é imprescindível para o sucesso dos sistemas de produção de ruminantes (CEZAR *et al.*, 2008). De acordo com Waller (2002), o equilíbrio natural parasita/hospedeiro foi alterado pelo homem em favor da população parasitária. Tal alteração ocorreu a partir da domesticação dos animais, das alterações ambientais com o aumento da densidade populacional e da intensificação dos sistemas de produção, bem como da seleção baseada considerando apenas as características de produção, aumentando assim a demanda por produtos veterinários que controlassem as infecções parasitárias.

Para o controle dessas enfermidades, o uso indiscriminado de medicamentos comerciais de maneira supressiva e sem considerar os fatores epidemiológicos envolvidos, são a opção erroneamente adotada pelos produtores. Essa ação favorece a seleção de populações parasitárias resistentes (MOLENTO, 2005). O diagnóstico da resistência anti-helmíntica não é fácil de ser feito pelos produtores e isso faz com que a utilização do mesmo medicamento ou do mesmo grupo de medicamentos seja continuada por mais tempo (CEZAR *et al.*, 2010).

No Brasil estão disponíveis no mercado diversos medicamentos utilizados para o tratamento de verminoses em ovinos pertencentes às classes dos benzimidazóis, imidazotiazóis, lactonas macrocíclicas, compostos nitrofenólicos e derivados de amino acetronitrila (AADs) (CHAGAS *et al.*, 2013). O processo de

desenvolvimento de um novo medicamento é muito lento, quando comparado com a velocidade com que relatos de resistência surgem, por isso é necessário que tal fenômeno seja identificado no início, para que a eficácia anti-helmíntica persista por um maior período de tempo (JAMES *et al.*, 2009).

Algumas práticas de manejo podem diminuir a resistência parasitária no rebanho, como adotar medidas estratégicas e seletivas de tratamento para manter um número maior de larvas em refugia (COSTA *et al.*, 2011). Tais larvas permanecem na pastagem sem sofrer ação dos medicamentos, sendo assim susceptíveis. A presença deste grupo nas pastagens é importante, pois as larvas em refugia minimizam o fenômeno da resistência anti-helmíntica diluindo as larvas infectantes (L3) resistentes, uma vez que tal ocorrência está diretamente ligada à permanência dos parasitas que sobrevivem ao tratamento com anti-helmínticos (VAN WYK, 2001). A seleção de ovinos geneticamente resistentes aos parasitas gastrintestinais é uma alternativa para controle da verminose (SALGADO; SANTOS, 2016).

O controle químico torna-se preocupante, uma vez que é feito de maneira indiscriminada, muitas vezes com o uso associado de medicamentos que, por sua vez, não têm adequado critério de uso e eficácia comprovada (FORTES; MOLENTO, 2013). Algumas alternativas de medicamentos para o controle de NGI são o monepantel (MNT) (KAMINSKY *et al.*, 2008) e o derquantel em combinação com abamectina (LITTLE *et al.*, 2010), duas novas classes de medicamentos com novos modos de ação e que se apresentam como promissores para tal tratamento.

O Monepantel (MNT) (Zolvix®, Zoetis, Holanda), lançado no mercado brasileiro sob registro nº 9.666 em 10/02/2012, é um medicamento antiparasitário do grupo derivado amino-acetonitrilo (AAD) que causa hiperparalisia da musculatura dos parasitas, possui baixa toxicidade em ruminantes e tem sido considerado uma alternativa para eliminar parasitas resistentes aos outros fármacos. Entretanto, mesmo sendo apresentado como alternativa ao tratamento de linhagens de parasitas multirresistentes, casos de resistência ao MNT já foram descritos na Nova Zelândia, Uruguai, Holanda e Brasil (Scott *et al.*, 2013; Mederos *et al.*, 2014; Van Den Brom *et al.*, 2015; Martins, 2016; Ramos, 2016), decorridos poucos anos de seu uso comercial.

Entender os mecanismos da resistência anti-helmíntica é importante para evitar que esse fenômeno ocorra, tendo por consequência a diminuição da velocidade de propagação de parasitas resistentes, adiando o aparecimento da resistência para outros medicamentos e tendo a possibilidade de combinação

adequada com outros anti-helmínticos disponíveis no mercado (PRICHARD, 2008). Os mecanismos de resistência podem ser específicos, quando associados à ação do medicamento, ou inespecíficos, quando fazem referência a alterações no receptor do medicamento ou na modulação da concentração do medicamento (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004).

O MNT atua na subunidade Hco-MPTL-1 do receptor nicotínico (nAChR) presente apenas em nematódeos. Ainda é desconhecido como ocorre a seleção de parasitas resistentes para este medicamento. Assim, o objetivo geral foi avaliar o processo de resistência dos nematodas em resposta à utilização do monepantel em ovinos naturalmente infectados, com teste fenotípico (contagem de ovos de parasitas nas fezes dos animais) após uso supressivo do MNT para ovinos manejados em pastagens. Essa avaliação permitirá determinar fatores associados ao fenômeno da resistência, podendo auxiliar na elaboração de melhores estratégias no controle dos parasitas de ovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o processo de resistência dos nematodos gastrintestinais através de avaliação fenotípica e a condição sanitária dos animais em resposta à utilização do monepantel em ovinos naturalmente infectados após uso supressivo do MNT para ovelhas manejadas em pastagens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o número de ovos de parasitas nematodos gastrintestinais nas fezes de ovelhas após uso supressivo do monepantel;
- monitorar o grau de anemia através do método FAMACHA© em ovelhas após o uso supressivo do monepantel;
- identificar as larvas de parasitos nematodos gastrintestinais presentes nas fezes de ovelhas após o uso supressivo do monepantel;
- avaliar o número de larvas infectantes nas pastagens utilizadas pelas ovelhas após o uso supressivo do monepantel e relacionar com as características da pastagem (altura e massa de forragem);

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OVINOS E INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Parasitas gastrintestinais têm se mostrado um grande entrave para a ovinocultura mundial, sendo que a redução na produção de carne, lã e leite, déficit no ganho ponderal, baixo aproveitamento nutricional, ocasionados por infecções clínicas e subclínicas estão associadas à ação desses parasitas (FORBES *et al.*, 2002). Vieira (2005) aponta que *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus* sp., *Cooperia* sp., *Oesophagostomum* sp., são os principais responsáveis por prejuízos econômicos na ovinocultura no Brasil.

Devido à sua grande patogenicidade e seu grande poder contaminante, o *Haemonchus* sp. é geralmente considerado o helminto de maior importância econômica para ovinos (HOSTE *et al.*, 2016). Segundo Strain e Stear (2001), o parasita adulto é hematófago, causando assim perdas proteicas, gastropatias tendo seu efeito agravado pela anemia dos ovinos, que pode levar à morte.

Fatores como aumento da densidade populacional, seleção dos animais considerando apenas os aspectos produtivos, como ganho de peso e produção de leite, e a alteração do equilíbrio natural parasita-hospedeiro, favoreceram o aumento da prevalência dos parasitas (WALLER, 2002). Para o controle dessas enfermidades, o uso indiscriminado de medicamentos comerciais de maneira supressiva e sem considerar os fatores epidemiológicos envolvidos, são a opção erroneamente adotada pelos produtores. Essa ação favorece a seleção de populações parasitárias resistentes (MOLENTO, 2005).

Objetivando diminuir os prejuízos ocasionados pelas doenças parasitárias, práticas como rotação de piquetes, uso de diferentes espécies animais no mesmo piquete, horário de pastejo e escolha de espécies forrageiras menos susceptíveis ao desenvolvimento das fases jovens dos parasitas podem ser utilizadas como forma de realizar o controle integrado dessas enfermidades (KRYCHAK-FURTADO *et al.*, 2005).

O controle químico torna-se preocupante, uma vez que é feito de maneira indiscriminada, muitas vezes com o uso associado de medicamentos que, por sua vez, não têm adequado critério de uso e eficácia comprovada (FORTES; MOLENTO, 2013). Algumas alternativas de medicamentos para o controle de NGI são o monepantel (MNT) (KAMINSKY *et al.*, 2008) e o derquantel em combinação com abamectina (LITTLE *et al.*, 2010), duas novas classes de medicamentos com novos modos de ação e que se apresentam como promissores para tal tratamento. O derquantel não se encontra disponível no Brasil e o MNT é comercializado desde o ano de 2012. Desta forma, é importante que seja prolongada a vida útil dos produtos disponíveis e isso pode ser alcançado através do seu uso estratégico, visando o controle adequado dos parasitas (FORTES; MOLENTO, 2013), evitando o uso indiscriminado dos produtos.

3.2 PRINCIPAIS MEDICAMENTOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DE OVINOS

No Brasil, estão disponíveis no mercado diversos medicamentos utilizados para o tratamento de verminoses em ovinos pertencentes às classes dos benzimidazóis, imidazotiazóis, lactonas macrocíclicas, compostos nitrofenólicos e derivados de amino acetronitrila (AADs) (CHAGAS *et al.*, 2013). O processo de desenvolvimento de um novo medicamento é muito lento, quando comparado com a velocidade com que relatos de resistência surgem, por isso é necessário que tal fenômeno seja identificado no início, para que a eficácia anti-helmíntica persista por um maior período de tempo (JAMES *et al.*, 2009).

O surgimento do tiabendazol em 1961 marcou o surgimento dos anti-helmínticos do grupo dos benzimidazóis (tiabendazol, albendazol, mebendazol, oxfendazol, triclabendazol), marcando o início da era moderna dos anti-helmínticos de amplo-espectro, uma vez que a vantagem destes em relação aos primeiros se dava pelo fato de serem mais seguros, eficazes contra diversos nematoides e possuírem estratégias de administração mais versáteis (ADAMS, 2003).

O tetramisole foi o primeiro medicamento dos imidazotiazóis, compondo o grupo juntamente com o levamisole e tais medicamentos passaram a ser

comercializados a partir de 1965. Seu mecanismo de ação se dá pela penetração no parasita através da cutícula, atuando nos receptores nicotínicos sinápticos e extrassinápticos das membranas das células musculares dos nematoides. Isso leva à abertura dos canais iônicos e acarreta no aumento da condução de sódio, provocando assim a despolarização da membrana. Devido a isso, esses compostos são considerados agonistas colinérgico, pois provocam contração muscular e paralisia espástica dos parasitas, que serão eliminados do hospedeiro (SPINOSA *et al.*, 2014).

Na classe das lactonas macrocíclicas (ivermectina, doramectina, abamectina, moxidectina) o modo de ação se dá através da potencialização de inibidores transmissores. Ocorre mediação dos receptores de canais de íons de cloro direcionados por glutamato, ocasionando paralisia da neuromusculatura (McKELLAR; JACKSON, 2004). Os medicamentos do grupo dos compostos nitrofenólicos (Nitroxinil, Nitroscanato) são classificados como anti-helmínticos de pequeno espectro, pois agem especificamente contra determinados parasitas causando o bloqueio das reações mitocondriais de transporte de elétrons, associados à síntese de ATP, o que resulta na inibição da fosforilação oxidativa e morte do parasita por exaustão (McKELLAR; JACKSON, 2004).

3.3 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM OVINOS

O aumento da capacidade dos parasitas em resistir ou sobreviver ao modo de ação de determinado medicamento, pode ser definida como resistência anti-helmíntica (VIEIRA, 2008). Tal resistência dificulta o controle das verminoses, afetando negativamente a produção na ovinocultura (KAPLAN *et al.*, 2004). Desta forma, visando o aumento da produção dos ovinos e a diminuição do uso dos medicamentos, a utilização desses medicamentos deve ser feita de maneira planejada, sendo atrelada ao manejo sanitário do rebanho e não apenas como única alternativa no controle de verminoses (AMARANTE; SALES, 2007).

Alguns fatores fazem com que os parasitas susceptíveis sejam eliminados da população, contribuindo para a sobrevivência dos resistentes, tais como tratamento de todo o rebanho, podendo ser de maneira frequente ou supressiva,

utilização do mesmo medicamento por um período prolongado, mudança do rebanho tratado para uma área livre de infestação parasitária, bem como a aplicação do medicamento de maneira sistemática sem considerar o estado clínico do animal e a necessidade de recebimento do medicamento (JACKSON *et al.*, 2012).

Algumas práticas de manejo podem diminuir a resistência parasitária no rebanho, como adotar medidas estratégicas e seletivas de tratamento para manter um número maior de larvas em refugia (COSTA *et al.*, 2011). Tais larvas permanecem na pastagem sem sofrer ação dos medicamentos, sendo assim susceptíveis. A presença deste grupo nas pastagens é importante, pois as larvas em refugia minimizam o fenômeno da resistência anti-helmíntica diluindo as larvas infectantes (L3) resistentes, uma vez que tal ocorrência está diretamente ligada à permanência dos parasitas que sobrevivem ao tratamento com anti-helmínticos (VAN WYK, 2001). A seleção de ovinos geneticamente resistentes aos parasitas gastrintestinais é uma alternativa para controle da verminose (SALGADO; SANTOS, 2016).

O diagnóstico da resistência anti-helmíntica não é fácil de ser feito pelos produtores e isso faz com que a utilização do mesmo medicamento ou do mesmo grupo de medicamentos seja continuada por mais tempo (CEZAR *et al.*, 2010). Em estudo realizado no Rio Grande do Sul, esses autores utilizaram 135 animais e constataram parasitas dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Ostertagia* resistentes ao levamisol, moxidectina, albendazol, ivermectina, closantel e à combinação dos medicamentos levamisol, albendazol e ivermectina. Os resultados obtidos foram 22,3; 1; 10; 1 e 10%, respectivamente, atestando desta forma a resistência anti-helmíntica a todos os principais grupos de medicamentos encontradas no Brasil.

Em estudo realizado em Santa Catarina, Rosalinski-Moraes *et al.* (2007) avaliaram a eficácia dos medicamentos levamisol, closantel, albendazol, ivermectina e moxidectina. Detectou-se resistência dos nematódeos para todos os medicamentos utilizados, onde em 100% das propriedades foi determinada resistência para ivermectina, em 66,7% à moxidectina, em 44,4% ao levamisol e em 75% observou-se falta de eficácia para os benzimidazóis.

3.4 MECANISMO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Entender os mecanismos da resistência anti-helmíntica é importante para evitar que esse fenômeno ocorra, tendo por consequência a diminuição da velocidade de propagação de parasitas resistentes, adiando o aparecimento da resistência para outros medicamentos e tendo a possibilidade de combinação adequada com outros anti-helmínticos disponíveis no mercado (PRICHARD, 2008). Os mecanismos de resistência podem ser específicos, quando associados à ação do medicamento, ou inespecíficos, quando fazem referência a alterações no receptor do medicamento ou na modulação da concentração do medicamento (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004).

A resistência aos benzimidazóis está ligada com alterações na tubulina, relacionando dois genes, isotipos 1 e 2, ao fenômeno. No isotipo 1 a mutação no gene seria a causa específica de resistência, pois essa mutação causa a troca da fenilalanina pela tirosina no códon F200Y da proteína. (SAMSON-HILMMELSTJERNA *et al.*, 2007). Desta forma o parasita susceptível possui o AA fenilalanina neste códon, enquanto o resistente possui a tirosina. Outras mudanças nos códons F167Y e F198A também podem estar relacionadas ao mecanismo de resistência aos benzimidazóis. Essas mudanças podem variar entre espécies de nematódeos, bem como entre isolados (GHISI *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistência dos medicamentos que agem nos receptores nicotínicos da acetilcolina são poucos conhecidos. Mudanças nos receptores nicotínicos podem estar relacionadas na resistência ao levamisol, morantel e pirantel (PRICHARD, 2008). Em um isolado de *Oesophagostomum dentatum* sensível ao levamisol, Robertson *et al.* (1999) encontraram os subtipos de receptores G25, G35, G40 e o G45, já no isolado resistente só não se observou o subtipo G35. Os mesmos autores demonstraram haver mais de 11 genes envolvidos na resistência ao levamisol ao avaliar o nematódeo *C. elegans*.

No caso do estudo da resistência à ivermectina, já foram confirmadas mutações nos genes que compõem os receptores para esse medicamento nas populações de nematoides resistentes, bem como polimorfismo da β -tubulina que está associado a resistência do *H. contortus* aos benzimidazóis (McCAVERA *et al.*,

2007). O primeiro gene associado à resistência das lactonas macrocíclicas em *H. contortus* foi o PGP-A, responsável pela expressão da P-gp (XU *et al.*, 1998).

A Phospho-glicoproteína (Pgp) integra o grupo dos transportadores ABC, responsáveis pelo efluxo celular, possibilitando que o medicamento seja expelido de dentro da célula. A Pgp garante que não haja acumulação intracelular e previne contra os efeitos citotóxicos do medicamento. A resistência às lactonas macrocíclicas pode estar associada às mudanças genéticas nesses transportadores (LANUSSE *et al.*, 2008). Os alelos que codificam os canais de cloro e glutamato estão associados aos alelos favoráveis à resistência de *H. contortus* às lactonas macrocíclicas (BLACKHALL *et al.*, 1998). Mottier e Prichard (2008) demonstraram em *H. contortus* e *O. volvulus* que as lactonas macrocíclicas também realizam uma substituição no códon 200 da tubulina (200 Tirosina e 167 Tirosina), similar às mudanças que ocasionam resistência aos benzimidazóis.

3.5 MONEPANTEL: UMA NOVA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA

O MNT foi desenvolvido em 2008 na Nova Zelândia e a partir de 2009 foi iniciada sua comercialização neste país, onde o mesmo mostrou-se efetivo contra nematoides multirresistentes (KAMINSKY *et al.*, 2011) e a partir de 2012 passou a ser comercializado no Brasil (MARTINS, 2016). Este medicamento pertence ao grupo dos derivados de amino acetronitrila (AADs) e foi desenvolvido para resolver a problemática de multirresistência em ovinos em todo o mundo (MARTINS, 2016).

O MNT atua com eficácia em estágios imaturos e adultos de nematoides resistentes ao benzimidazole, levamisol e lactonas macrocíclicas. O medicamento atua na subunidade Hco-MPTL-1 sobre o receptor nicotínico (nAChR) presente apenas em nematódeos, atuando como seu agonista direto, o que resulta na hipercontração e paralisia espástica do nematódeo. Esta é a primeira função biológica descrita para o receptor Hco-MPTL-1, fazendo com que o MNT seja eficaz contra nematódeos resistentes a outras classes de medicamentos (SPINOSA *et al.*, 2014).

O MNT deve ser administrado via oral na dose 2,5 mg/kg de peso corporal (PC), podendo ser utilizado inclusive em ovelhas gestantes e lactantes, bem como

em reprodutores. A alimentação ou o jejum antes ou após a administração do medicamento não influenciam sua eficácia. A excreção do MNT ocorre em sua maioria pelas fezes, mas também é excretado pela urina (EMA, 2017). O produto apresenta boa biodisponibilidade quando administrado via oral e possui meia vida terminal de 215h (SPINOSA *et al.*, 2014).

Bustamante *et al.* (2009) conduzindo uma pesquisa nos países sul-americanos Argentina, Brasil e Uruguai confirmaram a eficácia deste medicamento em ovinos. No estudo realizado por Cintra *et al.* (2016) foi relatada a resistência do *T. colubriformis* ao MNT em uma criação de ovinos no município de Fazenda Rio Grande, no Estado do Paraná.

3.6 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AO MONEPANTEL

O MNT é o primeiro representante do grupo dos AADs, sendo um medicamento com diferente mecanismo de ação (KAMINSKY *et al.*, 2008a). A fim de estudar o mecanismo de ação desse grupo de medicamento, os primeiros estudos foram realizados em *Caenorhabditis elegans*, determinando o gene *acr-23* como o principal alvo nesta espécie de nematoide (KAMINSKY *et al.*, 2008b). Com a descoberta do gene *acr-23*, foi possível investigar o modo de ação do MNT em nematoides. Desta forma, não é possível saber se o gene *acr-23* é o único responsável pela resistência aos AADs (RUFENER *et al.*, 2009).

O ensaio para o nAChR do *H. contortus* foi originalmente designado Hc-ACR-23H com base na sequência parcial que estava mais diretamente relacionada com o gene ACR-23 do *C. elegans* (KAMINSKY *et al.*, 2008).

Entretanto esta nomenclatura parece ter sido prematura, uma vez que o nAChR do *H. contortus* mostrou estar mais estreitamente relacionado com o gene ACR-20 do *C. elegans*. Na ausência de um registro completo, Rufener *et al.* (2009) propuseram nomear o gene monepantel-1 como Hco-mptl-1, devido ao seu aparente envolvimento na sensibilidade ao MNT.

Estudos recentes relatam casos de resistência ao MNT, sendo que Scott *et al.* (2013) observaram 0% de eficácia para o MNT em caprinos e ovinos através do teste de redução da contagem de ovos na Nova Zelândia. No Uruguai, Mederos *et*

al. (2014) avaliaram a eficácia do MNT através do teste de redução de ovos em duas criações de ovinos, comprovando a resistência para *Haemonchus* sp., em coproculturas realizadas antes e após a administração do medicamento. Na Holanda, Van Den Brom *et al.* (2015) relataram resistência em uma criação de ovinos. No caso deste país, a introdução do medicamento ocorreu em 2011 e tais relatos foram feitos em 2014 nesta mesma propriedade, onde foram encontrados 100% de larvas de *Haemonchus* sp. nas coproculturas realizadas pré e pós tratamento. Nos trabalhos citados onde comprovou-se a resistência ao MNT (SCOTT *et al.*, 2013; MEDEROS *et al.*, 2014; VAN DEN BROM *et al.*, 2015), não foram realizados estudos moleculares para melhor entendimento desse fenômeno.

No Brasil, estudos realizados nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul relataram casos de resistência parasitária ao MNT. Em uma propriedade localizada na região de Jaboticabal (SP), Martins (2016) confirmou a suspeita de ineficácia do medicamento para *H. contortus*, podendo estar associada à utilização do medicamento de forma massiva por um período de apenas um ano. No Rio Grande do Sul, Ramos (2016) avaliou a eficácia do MNT em duas propriedades. O resultado encontrado foi de 25,8% e 78,4%, respectivamente, nas propriedades 1 e 2, sendo que os gêneros que apresentaram resistência foram *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia*.

Em condições experimentais, a resistência ao MNT foi atestada para *Caenorhabditis elegans* e *H. contortus*, onde o fenômeno foi estimulado através de subdosagens do medicamento e o mecanismo de ação relacionou-se aos genes que sofreram mutações, sendo estes das subunidades do receptor nAChR.

3.7 MANEJO DE PASTAGEM COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE PARASITOSE EM OVINOS

O controle de infecções parasitárias é imprescindível para o sucesso dos sistemas de produção de ruminantes (CEZAR *et al.*, 2008). De acordo com Waller (2002), o equilíbrio natural parasita/hospedeiro foi alterado pelo homem em favor da população parasitária. Tal alteração ocorreu a partir da domesticação dos animais, das alterações ambientais com o aumento da densidade populacional e da

intensificação dos sistemas de produção, bem como da seleção baseada considerando apenas as características de produção, aumentando assim a demanda por produtos veterinários que controlassem as infecções parasitárias.

As práticas de manejo de pastagem, visando o controle de parasitas gastrintestinais, levam em consideração que parte do ciclo biológico destes parasitas ocorre no pasto. Desta forma, tais práticas têm como objetivo impedir ou diminuir o contato das formas infectantes dos parasitas com os hospedeiros que apresentem susceptibilidade (STAFFORD; COLES, 1999; WALLER, 2002; MOLENTO, 2004).

O pastejo rotacionado é uma prática interessante do ponto de vista agrostológico e zootécnico por permitir o aperfeiçoamento das áreas reservadas para o pastejo do rebanho, bem como por ser uma alternativa para diminuir a quantidade de larvas infectantes nas pastagens (TORRES, 2008).

Segundo Bianchin *et al.* (1993), o pastejo rotacionado compreende a divisão da área a ser pastejada em piquetes que recebem uma alta densidade animal por períodos curtos. Após a retirada dos animais é feito o intervalo para que se atinja novamente o ponto ideal de pastejo. O manejo de pastagem utilizando essa ferramenta associa o aproveitamento da forragem do ponto de vista nutricional e o intuito anti-parasitário, mas para que este último seja devidamente alcançado é necessário que o período de permanência dos animais em cada piquete seja inferior ao de desenvolvimento das larvas infectantes e o período de intervalo seja suficiente para invibializar estas mesmas, resultando assim em uma baixa infecção parasitária e bons índices nutritivos. No entanto, em casos de alta densidade animal há uma elevada taxa de infestação na pastagem e caso o tempo de permanência nos piquetes coincida com o necessário para haver desenvolvimento e migração larvar, a ingestão de larvas infectantes será maior que em condições normais de pastejo.

3.8 TESTES PARA DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

Caso exista a suspeita de resistência antiparasitária no rebanho, é necessário que se determinem alguns dados epidemiológicos na propriedade tais como frequência de aplicação do medicamento, tipo de medicamento utilizado,

categorias mais atingidas, manejo do rebanho e estação do ano em que ocorrem mais casos da doença (CEZAR *et al.*, 2010).

A realização de testes específicos para diagnóstico de resistência inclui os modelos *in vitro* e *in vivo* (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004). Tais avaliações, aliadas à obtenção de dados epidemiológicos, são importantes para o correto diagnóstico da resistência antiparasitária (PRICHARD *et al.*, 1980).

3.9 TESTES FENOTÍPICOS: MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

3.9.1 Teste *In Vitro*

Quando comparado aos métodos *in vivo*, os testes *in vitro* são alternativas, em grande parte, mais rápidas, econômicas e menos trabalhosas. Estes testes têm a vantagem de diminuição ou anulação dos efeitos causados pela interferência do hospedeiro no momento do estabelecimento da infecção parasitária (DEMELER *et al.*, 2012).

3.9.1.1 Teste de Eclosão de Ovos (TEO)

Este teste serve de modelo para o desenvolvimento de outros testes *in vitro* e é baseado na atividade ovicida do medicamento. Sua descrição é feita para detectar a resistência aos benzimidazóis. Ovos de nematoides não desenvolvidos são incubados com diferentes concentrações de benzimidazole, cuja ação irá impedir o embrionamento e eclosão desses ovos, e após o tempo determinado é feita a contagem de ovos e larvas (SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009).

3.9.1.2 Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL)

O teste é utilizado para comparar o número de larvas infectantes que sobrevivem na presença e na ausência do medicamento. É mais utilizado em ovinos e equinos com resultados confiáveis para testes com benzimidazóis e levamisol, possibilitando a avaliação simultânea de resistência a esses medicamentos (COLES *et al.*, 2006). Mais recentemente Dolinská *et al.* (2012) avaliando dois isolados de *H. contortus*, um susceptível e um resistente às lactonas macrocíclicas, encontraram resultados satisfatórios para detecção da resistência à ivermectina.

3.9.1.3 Teste de Migração Larvar (TML)

São usados para avaliar o efeito dos medicamentos que irão causar paralisia na musculatura somática dos parasitas. A motilidade larvar pode ser determinada por observação, detector eletrônico ou migração através de peneiras. Demeler *et al.* (2010) realizaram estudo com objetivo de desenvolver procedimentos padronizados para a detecção e análise de resistência contra ivermectina, tiabendazóis e levamisol em nematóides de bovinos, permitindo que houvesse separação de larvas móveis e imóveis por meio da migração através das peneiras.

3.9.2 Teste *In Vivo*

Apesar de possuir um custo mais alto que os testes *in vitro* e ter como característica uma avaliação de menor qualidade devido à variação inter-animal, são utilizados para monitorar a resistência parasitária (CRAVEN *et al.*, 1999). Além disso, são necessários aspectos fundamentais da farmacologia do medicamento que não podem ser considerados nos ensaios *in vitro*: a função da farmacodinâmica no hospedeiro, a interação parasita-hospedeiro e o modo de ação do medicamento (LACEY, 1988).

3.9.2.1 Teste de Redução na Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF)

O TRCOF é visto como confiável quando apresenta mais de 25% de parasitas resistentes em uma população (MILLER *et al.*, 2006). É um método de fácil execução e interpretação, sendo assim o mais utilizado para detectar e monitorar a resistência anti-helmíntica. O cálculo da eficácia é determinado, comparando as contagens de ovos de parasitas nas fezes antes e depois do tratamento (DOBSON *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de seu uso constante no monitoramento da resistência, o teste caracteriza-se por ter pouca sensibilidade, uma vez que pode haver baixa correlação entre a contagem de ovos nas fezes e a quantidade de parasitas adultos no hospedeiro. Esse relato não se aplica ao parasita *H. contortus* devido à sua alta prolificidade. Pode haver ainda limitação no diagnóstico em casos de baixa prevalência da resistência (TAYLOR *et al.*, 2002).

3.9.2.2 Teste controlado de eficácia

Este teste avalia a infecção e o efeito do medicamento com a necessidade de necropsia dos animais e de mão-de-obra qualificada, sendo assim um método mais caro (TAYLOR *et al.*, 2002). Para estudo, os animais são separados em diferentes grupos, entre controle e tratamento e a dose de anti-helmíntica utilizada é a terapêutica, considerando o produto com eficácia $\geq 99\%$. Após necropsia dos animais, são contados os parasitas, considerando a redução ou eliminação dos mesmos, por onde irá ser determinada a eficácia do tratamento, sendo considerado um quadro de resistência anti-helmíntica caso o resultado obtido seja $< 95\%$ (COLES *et al.*, 2006).

3.10 TESTE GENOTÍPICO

O diagnóstico de parasitas resistentes utilizando técnicas moleculares tem concentrado muito investimento, no entanto a característica poligênica das populações de nematodas torna-se um desafio para os pesquisadores da área, sendo necessária a descoberta do mecanismo de resistência dos parasitas aos medicamentos, bem como os marcadores moleculares específicos (FORTES; MOLENTO, 2013).

A base molecular da resistência parasitária para as lactonas macrocíclicas e levamisol é muito estudada, apesar de não existirem testes moleculares disponíveis para tais medicamentos. Estudos realizados com *C. elegans* relataram quatro conjuntos de proteínas que contribuem para a resistência ao levamisol nesse nematoda. Os receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) são o principal foco de estudos para a expressão ou detecção de polimorfismos associados à resistência parasitária ao levamisole (MARTIN *et al.* 2012).

O teste de genotipagem de apenas uma larva ou verme adulto é caro e trabalhoso, desta forma devem ser desenvolvidos testes moleculares para PCR a fim de adequar e viabilizar a técnica para uso laboratorial com amostras de campo. O uso rotineiro de testes moleculares poderá ser disponibilizado caso haja um diagnóstico de resistência baseado no uso de um *pool* de amostras de DNA de larvas (FORTES; MOLENTO, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Número do Protocolo 001/2017 pela CEUA).

4.1 LOCAL

O estudo foi conduzido no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC) na Fazenda Experimental Cangüiri, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizada no município de Pinhais (PR), com coordenadas geográficas aproximadas: 25°24'4.31"S de latitude e 49°7'15.02"O de longitude, 918 m de altitude. Segundo classificação de Köppen, o clima da região é descrito como Cfb, com precipitação anual média de 1.400 mm e temperaturas médias variando de 12,5°C a 22,5°C, sujeito a geadas frequentes e severas (IAPAR, 2018).

4.2 TRATAMENTOS, MANEJO E DESENHO EXPERIMENTAL

Na Figura 1 apresenta-se um esquema das avaliações mensais realizadas durante o período experimental, que ocorreu entre os meses de março a agosto de 2017, totalizando 203 dias.

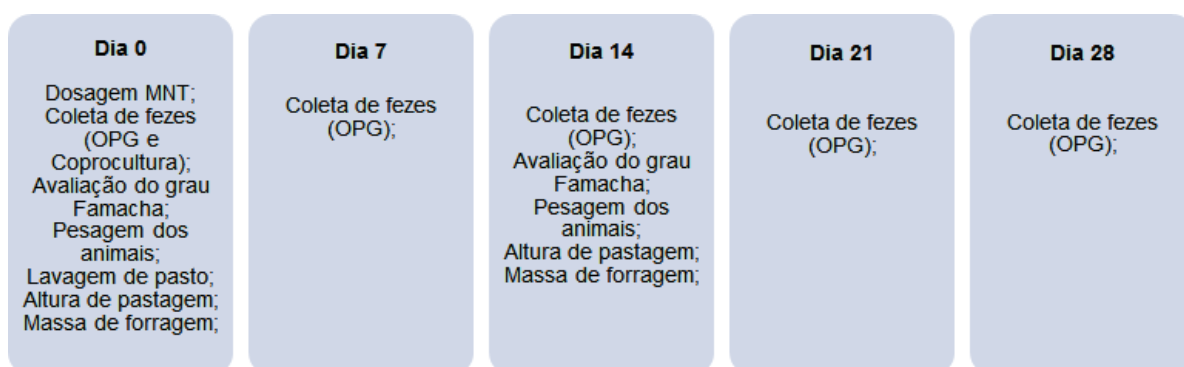


FIGURA 1 - ESQUEMA DE ATIVIDADES EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

FONTE: Elaborado pelo Autor (2018)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e 15 repetições (animais). Foram utilizadas 45 ovelhas adultas mestiças Suffolk e White Dorper, com idade média inicial de 5 anos e peso médio inicial de 83 kg, naturalmente infectadas com NGI que estavam divididas em três grupos de 15 animais. Os tratamentos foram: (1) CONTROLE, com avaliação do grau de anemia pelo método FAMACHA® (FMC) a cada 15 dias, recebendo tratamento com monepantel (MNT) na dose terapêutica apenas se o grau FMC for ≥ 3 ; (2) Monepantel na dose de 20 mg/kg (dose terapêutica) a cada 30 dias e tratamento (3): Monepantel na dose de 40 mg/kg, duas vezes a dose terapêutica, a cada 30 dias. Os animais receberam as doses do medicamento via oral de acordo com o grupo ao qual pertenciam conforme a recomendação do fabricante (Figura 2).



FIGURA 2 - DOSAGEM PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS
FONTE: Autor (2018)

Os animais foram manejados em área de pastagem perene de Tifton 85 (*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85), com sobressemeadura de aveia preta (*Avena strigosa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e os grupos de 15 animais foram alocados em piquetes com 0,25 ha de área, cada. Os grupos experimentais foram rotacionados entre quatro diferentes piquetes cada um, onde a troca dos animais ocorreu semanalmente considerando a altura da pastagem (Figura 3). As alturas da

pastagem, para entrada e saída dos animais, foram estabelecidas entre 20 e 10 cm, respectivamente, de acordo com Carvalho (2004). Os animais foram alocados na pastagem sete dias antes do período de início de administração do medicamento, para a fase de adaptação.

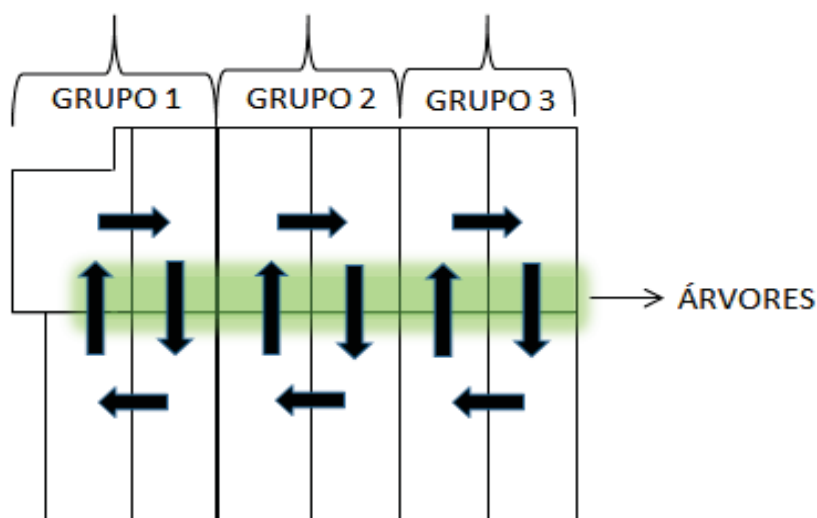


FIGURA 3 - ÁREA EXPERIMENTAL E SIMULAÇÃO DE ROTAÇÃO ENTRE PIQUETES PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

FONTE: Elaborado pelo Autor (2018)

Os animais permaneceram nos piquetes durante oito horas diurnas e a noite foram estabulados para fornecimento de suplemento concentrado (ração comercial Algomix, marca Algomix) composto por farelo de soja, farelo de trigo, melaço de cana em pó, milho integral moído, casca de soja moída e premix mineral e vitamínico, calculado semanalmente, com base no peso vivo médio dos animais (1% PV) contendo 16% de proteína bruta.

4.3 AVALIAÇÕES REALIZADAS NA PASTAGEM

4.3.1 Contagem e Identificação de Larvas Infectantes (L3) Presentes na Pastagem

A cada 30 dias ocorreram as coletas de amostras de pastagem para conhecimento do grau de infestação parasitária na pastagem. A amostragem foi feita em todo o pasto, seguindo uma linha com o formato em X, com corte rasteiro do

mesmo utilizando tesouras, sendo o material acondicionado em sacos plásticos (MOLENTO *et al.*, 2016). Após a coleta de amostras do pasto o protocolo de lavagem dos pastos para contagem de larvas no estágio L3 foi realizado de acordo com Molento *et al.* (2016) (Anexo 1) (Figura 4).

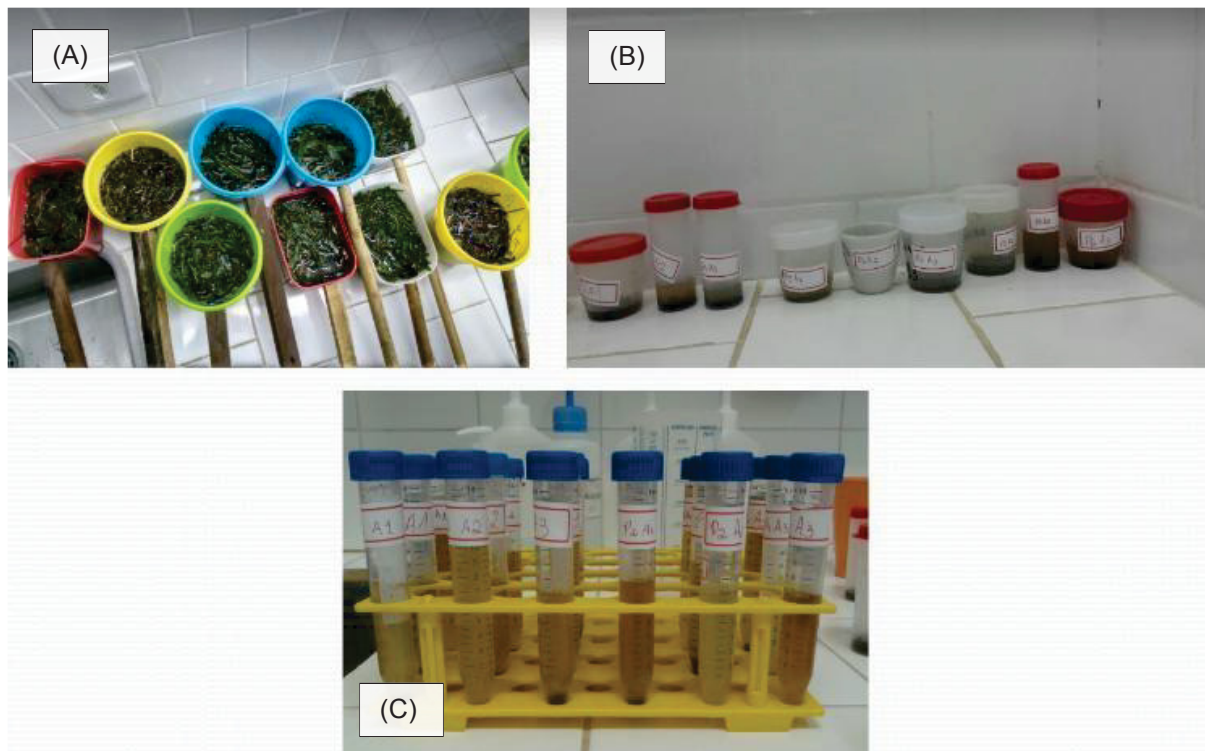


FIGURA 4 - ETAPAS DA LAVAGEM DE PASTO PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS. A) AMOSTRAS PICADAS EM DECANTAÇÃO; B) AMOSTRAS PÓS-DECANTAÇÃO; C) AMOSTRAS PRONTAS PARA ANÁLISE

FONTE: Elaborado pelo Autor (2018)

4.3.2 Altura da Pastagem

A altura do pasto foi avaliada através de leituras quinzenais em cada unidade experimental, usando-se o bastão graduado (*sward stick*) e basearam-se no procedimento descrito por Barthram (1986). A altura do ponto de amostragem correspondeu à média aritmética de 60 leituras feitas em cada piquete. A partir dos valores de altura obtidos ocorriam as mudanças de piquetes dos grupos experimentais, sendo estas entre 20 e 10 cm para entrada e saída dos animais nas áreas experimentais, respectivamente. As avaliações foram feitas por dois avaliadores durante todo o período experimental e totalizaram 18 leituras ao final do experimento.

4.3.3. Disponibilidade da Massa de Forragem

Para o cálculo da massa de forragem (MF), utilizou-se um aro de ferro de 0,1 m² e duas amostras de forragem foram coletadas por piquete. As amostras de área delimitada foram cortadas rente ao solo, armazenadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 72h para a determinação da matéria seca (MS).

4.4 AVALIAÇÕES REALIZADAS NOS ANIMAIS

4.4.1 Contagem do Número de Ovos por Grama de Fezes (OPG)

A análise dos níveis de infecção parasitária de cada animal foi realizada através da técnica de contagem de ovos de helmintos nas fezes (OPG) (Figura 5). As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal de todos os animais experimentais e armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados e após a finalização das coletas foram feitas as análises e leituras do material coletado.

As contagens de OPG foram realizadas semanalmente, antes de cada animal receber os respectivos tratamentos, avaliando assim o nível de infecção pré-experimental. Os valores de OPG foram determinados segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada.

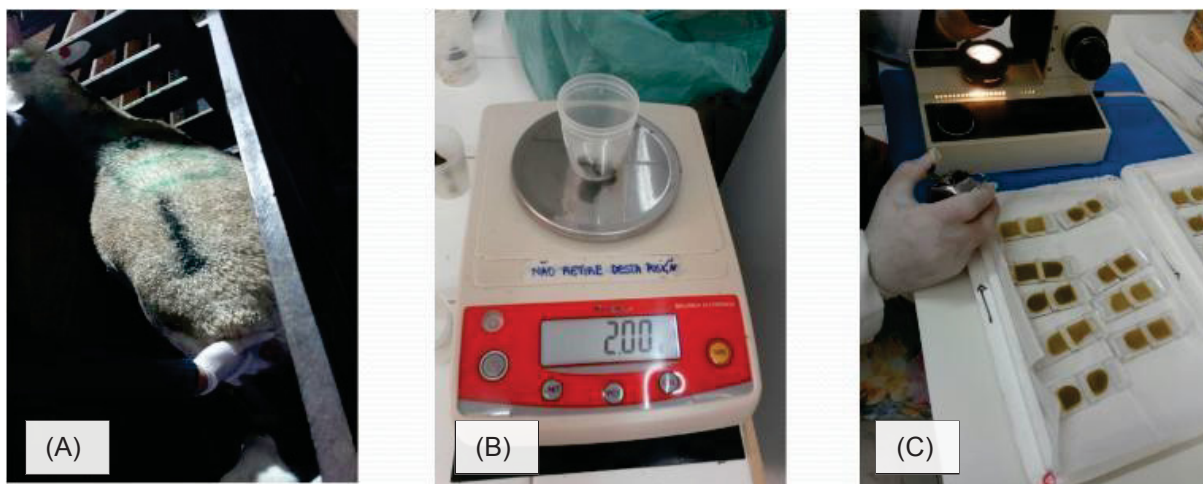


FIGURA 5 - COLETA DE FEZES, PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS. A) COLETA DIRETO DA AMPOLA DO RETO DO ANIMAL; B) PESAGEM DA AMOSTRA DE FEZES EM BALANÇA DE PRECISÃO; C) AMOSTRAS NAS CAMARAS DE MAC MASTER PARA CONTAGEM

FONTE: Elaborado pelo Autor (2018)

4.4.2. Teste de Redução de Contagem de Ovos nas Fezes (TRCOF)

O dia da aplicação do MNT foi considerado o dia zero (D0) do TRCOF. Após as dosagens os animais permaneceram por 2h em observação na central de manejo e após esse tempo retornaram para a área de pastagem em que estavam antes da realização do teste.

A via de aplicação do MNT seguiu a recomendação do fabricante e os animais foram pesados para o cálculo correto da dose administrada. As coletas de fezes para realização do teste seguiram nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, e foram reiniciados no D0 do mês subsequente, totalizando um período de seis meses de avaliações a fim de obter a porcentagem de eficácia do MNT. Os procedimentos de coleta, armazenamento e leitura das amostras seguiram o mesmo modelo descrito no item 4.4.1.

4.4.3 Coprocultura

As coproculturas foram realizadas mensalmente, utilizando-se uma amostra composta formada com as fezes dos 15 animais de cada tratamento, de acordo com Roberts e O'Sullivan (1950).

As amostras compostas de fezes foram depositadas até a metade de um recipiente de vidro, fechado com uma placa de Petri, e para que a umidade

aumentasse foi borrifada água sobre o material. Após isso, as amostras foram cultivadas em estufa a 28°C por 10 dias. Após o tempo de cultivo, o frasco de vidro foi todo preenchido com água morna, fechado com a placa de Petri e, para a recuperação das larvas infectantes, frasco e placa foram invertidos de maneira brusca evitando assim que a água fosse derramada. Em seguida a placa de Petri foi preenchida com água, que foi recolhida com pipeta após quatro a oito horas. Após isso, a água foi acondicionada em tubo de ensaio identificado e armazenado em geladeira por 2 a 3 horas, para que houvesse decantação das larvas. Em seguida, o sobrenadante foi removido, para que as larvas permanecessem em volume de 2 ml.

4.4.4. Pesagem, Avaliação do Grau FAMACHA® (FMC) e do Escore de Condição Corporal

Todos os animais foram pesados e avaliados quanto ao grau FMC nos dias 0 e 14 durante os seis meses de experimento (Figura 6). A avaliação do grau FMC foi feita de acordo com a metodologia de Van Wyk *et al.* (1997), considerando os valores de 1 a 5. O escore de condição corporal (ECC) era avaliado segundo a metodologia de Jefferies (1961), considerando uma escala de 1 a 5, do animal extremamente magro (1) ao animal obeso (5). As pesagens foram feitas no D0 para correta dosagem do MNT nos animais dos grupos G2 e G3. As avaliações do ECC foram feitas a cada 15 dias, coincidindo com as avaliações do grau FMC.

A avaliação do grau FMC dos animais do G1 era feita no D0 como parâmetro para dosagem do MNT em caso de grau FMC ≥ 3 .

As coletas para avaliação do hematócrito (Ht) foram feitas mensalmente no mesmo dia em que ocorreram as dosagens do MNT (D0). O material sanguíneo foi coletado por venopunção jugular dos animais pertencentes aos três grupos experimentais e então acondicionados em tubos com anticoagulante (10% de EDTA). Foi utilizada a técnica do microhematócrito para determinação dos valores de Ht, com a utilização de tubos capilares sendo centrifugados a 12000 rpm durante 8 minutos.



FIGURA 6 - PROCEDIMENTOS PARA DOSAGEM DO MONEPANTEL E AVALIAÇÃO DO GRAU FMC PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

FONTE: Autor (2018)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir das avaliações de OPG, grau FMC, peso e número de larvas na pastagem foram submetidos ao teste de esfericidade de Mauchly com significância ($P < 0,05$) e foram avaliados por análise estatística univariada com medidas repetidas no tempo, através do Proc GLM do SAS (2015). A análise estatística gerou duas saídas de dados, sendo a primeira o efeito do tratamento sobre a variável analisada, e a segunda o efeito de tempo e a interação tempo x tratamento. Os efeitos tempo e tratamento são independentes entre si.

O modelo estatístico utilizado para análise de variância foi $Y_i = \mu + T_i + e_i$, onde Y_i corresponde à variável dependente; μ , à média geral; T_i , ao efeito dos tratamentos e e_i , ao resíduo.

Para os dados de massa de forragem, altura de pastagem e número de larvas na pastagem foi feita a análise de correlação de Spearman conforme o Procedimento CORR do SAS (2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFICÁCIA DO MONEPANTEL

Os dados referentes à redução na contagem de ovos nas fezes no 7º dia pós-tratamento de cada mês de avaliação estão representados na Figura 7.

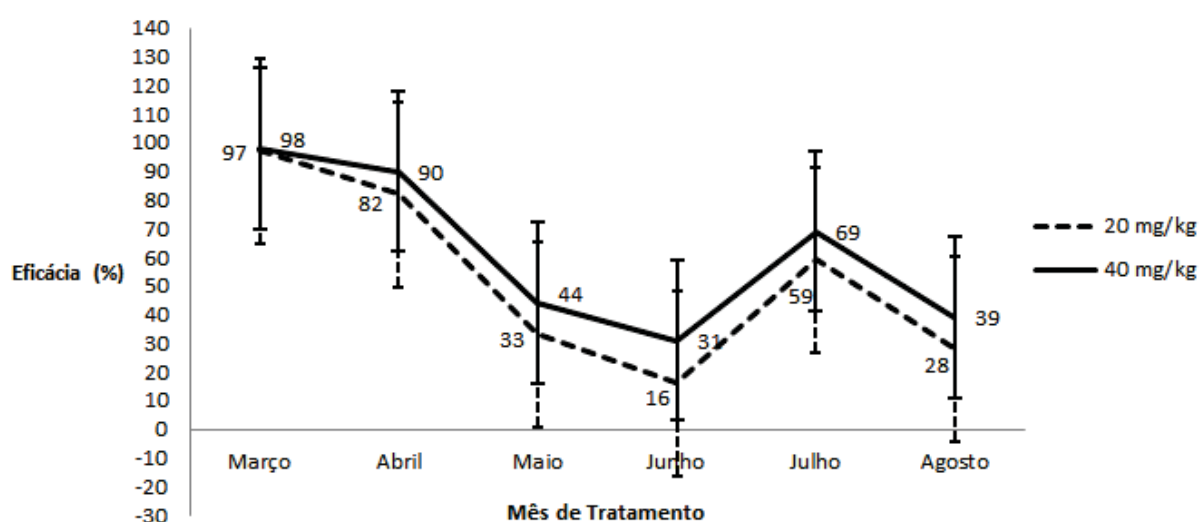


FIGURA 7 - EFICÁCIA DO MONEPANTEL CONSIDERANDO A CONTAGEM DE OPG EM OVELHAS MESTIÇAS SUFFOLK X WHITE DORPER NO 7º DIA PÓS-TRATAMENTO DE CADA MÊS, PARA AS DOSES 20 E 40 MG/KG PC

A redução na contagem de ovos nas fezes referente ao dia 7 pós-tratamento do mês de março mostra que o grupo que recebeu a dose 20mg/kg do medicamento (G2) obteve valor de eficácia efetivo (97%). O grupo que recebeu 40mg/kg de MNT (G3) obteve 98% de eficácia no mesmo período de avaliação. Os dados do TRCOF desses grupos referentes aos meses subsequentes no dia 7 pós-tratamento mostram que o MNT foi ineficaz em todas as análises, atestando uma possível resistência anti-helmíntica ao medicamento.

Os resultados encontrados a partir do TRCOF mostraram ineficácia do MNT a partir do segundo mês de avaliação, para as diferentes doses administradas nos animais experimentais. A eficácia do MNT apresentou leve aumento no mês de julho, período no qual os animais foram realocados em outra área experimental que não estava sendo pastejada anteriormente. Os animais foram realocados para a

nova área quando a altura média de saída atingiu 9 cm ao final de quatro meses (março a junho de 2017). Por ser área de pastagem que não estava em utilização, as alturas médias de entrada e saída foram 30 e 21 cm, respectivamente, e notou-se que isso ocorreu simultaneamente ao aumento da resposta do MNT quanto à eficácia. No entanto, mesmo assim, os valores obtidos no mês de Julho para as doses administradas do MNT permaneceram inferiores a 95%, apesar da melhora na resposta após a mudança da área experimental.

Scott *et al.* (2013) relataram pela primeira vez, na Nova Zelândia, a resistência ao MNT com OPG em ovinos para os parasitas *T. circumcincta* e *T. colubriformis*. Outros dois relatos de resistência ao MNT foram feitos por Mederos, Ramos e Banchemo (2014), no Uruguai, e por Van den Brom *et al.* (2015), na Holanda, para o parasita *Haemonchus*. No Brasil já foram descritos casos de resistência ao MNT nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul com OPG, mas no estado de Minas Gerais os resultados obtidos com o uso do MNT foram satisfatórios quando comparados com o albendazole (MARTINS, 2016; RAMOS, 2016; ALMEIDA, 2016). Nos trabalhos citados acima a dose de MNT utilizada foi de 20 mg/mg, conforme recomendado pelo fabricante.

Em Minas Gerais foi feita a avaliação da eficácia anti-helmíntica do MNT por OPG em rebanho ovino, comparado ao albendazole. As fezes foram coletadas nos dias 1, 3, 7 e 14 pós-tratamento. O MNT apresentou eficácia de 92,5; 99,67; 100 e 99,83%, nos respectivos dias, enquanto o albendazole teve os valores 0; 5,95; 26,09 e 20,23% de eficácia nos respectivos dias. Desta forma, o autor concluiu que o MNT apresentou excelente eficácia contra os helmintos resistentes ao albendazole (ALMEIDA, 2016).

No estudo feito em São Paulo foi realizado o TRCOF em 10 propriedades de ovinos identificando a eficácia do MNT. Foram descritas duas propriedades onde o MNT foi ineficaz, duas em que foi eficaz e nas outras seis foi altamente eficaz. Observou-se *H. contortus* resistente após realização do teste crítico com eficácia de 24,65% (MARTINS, 2016).

No Rio Grande do Sul foi desenvolvido um estudo com o objetivo de verificar a eficácia do MNT com OPG sobre nematódeos gastrointestinais de cordeiros naturalmente infectados em duas propriedades distintas. A eficácia do MNT foi de 25,8 e 78,4%, respectivamente, nas propriedades 1 e 2, sendo que os gêneros que apresentaram resistência foram *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia*

(RAMOS, 2016).

No presente trabalho a identificação das larvas após as coproculturas mostraram a presença de 71% de *Haemonchus contortus*, 15% de *Trichostrongylus* spp., 6% de *Oesophagostomum venulosum*, 5% de *Cooperia* spp. e 3% de *Chabertia ovina* nas amostras do Grupo Controle. Nas amostras do G2, que receberiam a dose terapêutica do fármaco, os valores encontrados foram de 82% de *Haemonchus contortus*, 15% de *Trichostrongylus* spp., 3% de *Oesophagostomum venulosum* e 5% de *Cooperia* spp. Nas identificações realizadas com amostras dos animais pertencentes ao G3, que recebiam o dobro da dose terapêutica do MNT, foram encontradas, em média, 81% de *Haemonchus contortus*, 15% de *Trichostrongylus* spp., 2% de *Cooperia* spp. e 2% de *Chabertia ovina*. Dessa forma, os parasitas encontrados nas fezes dos animais não diferiram entre os grupos. No presente estudo os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Cooperia* apresentaram resistência ao MNT ao final do período experimental de seis meses.

5.2 PESO

Na Figura 8 são apresentados os dados referentes aos pesos dos animais dos três grupos experimentais, durante o período experimental. Não houve efeito de tratamento ($P=0,75$) sobre o peso; no entanto houve efeito de período ($P<0,0001$) e interação tratamento x período ($P<0,0001$). Na Figura 9 são apresentados os dados referentes ao escore de condição corporal dos animais dos três grupos experimentais, durante o período experimental.

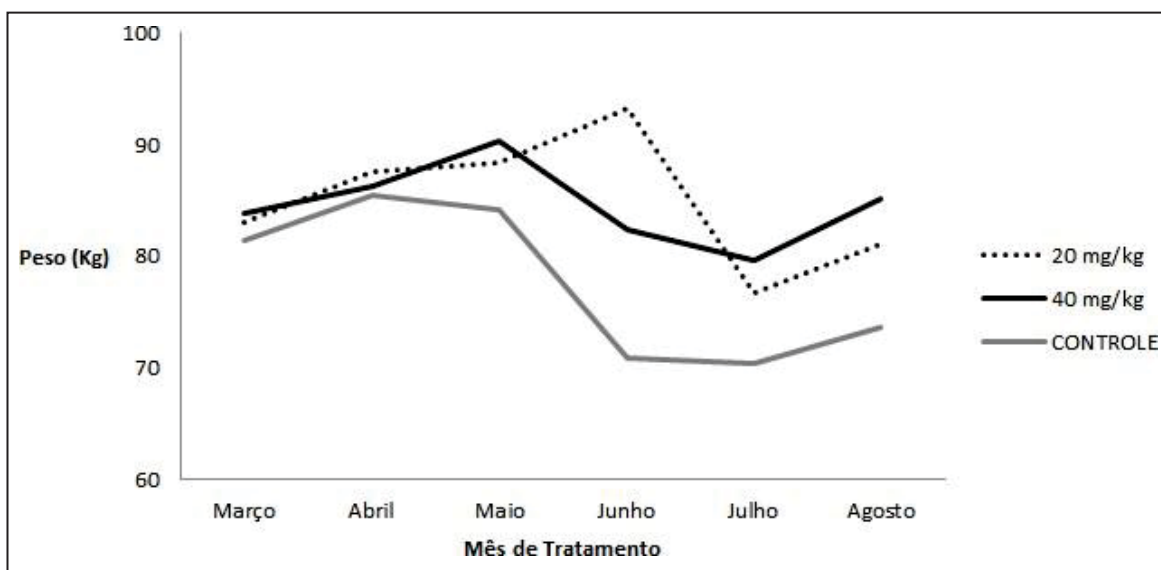


FIGURA 8 - PESO DOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

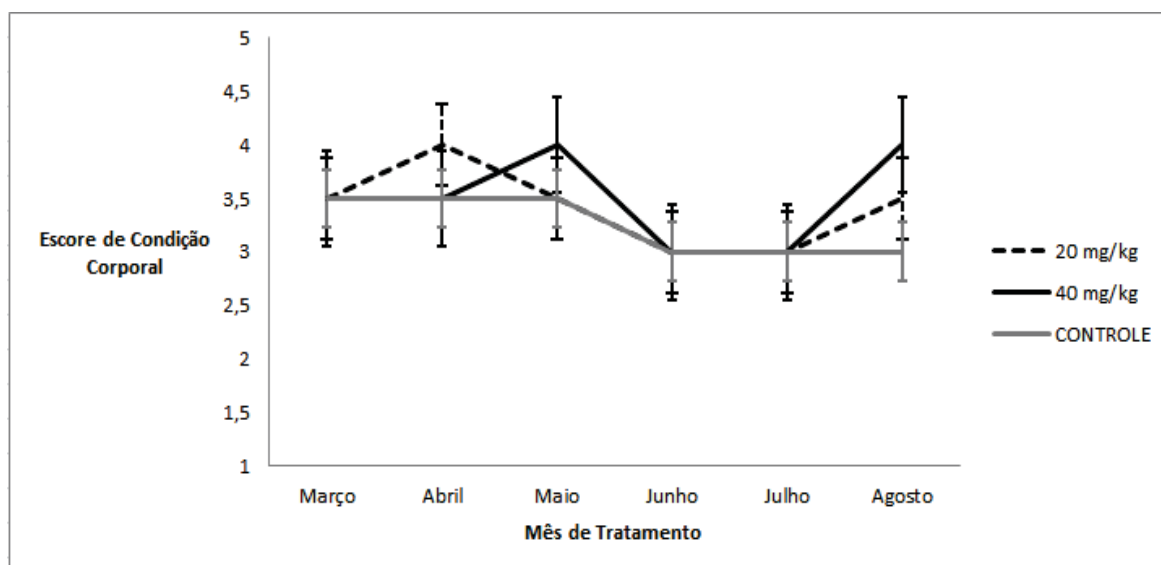


FIGURA 9 – ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL DOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

Analisando a variável peso das ovelhas, ao longo dos meses de experimento, nota-se que o peso médio dos animais dos diferentes grupos foi semelhante nos três primeiros meses (março a maio de 2017), período em que as ovelhas estavam em final de gestação. Os animais do Grupo Controle apresentaram a menor média de peso entre os grupos, no mês de Junho. Tal resultado sofreu interferência da parição das ovelhas, que ocorreu em Junho de 2017, e refere-se

provavelmente à maior incidência de partos gemelares desses animais que foi 32% quando comparado aos 12% nos animais do G2 e 20% no G3.

De acordo com Kenyon *et al.* (2009), o ECC e o ganho de peso podem ser usados para avaliar o estado nutricional dos ovinos, podendo assim identificar animais susceptíveis à infecção parasitária, principalmente onde há incidência de *H. contortus*. Entretanto, Wallace *et al.* (1999) afirmam que usar somente o ganho de peso para avaliar o efeito da infecção parasitária sobre os animais pode não ser completamente confiável, uma vez que há relatos onde não foram observadas diferenças significativas entre animais saudáveis e infectados quando comparados por esse parâmetro.

Os animais do presente experimento permaneceriam nos piquetes experimentais por 8h diurnas e então foram estabulados para fornecimento de suplemento concentrado, contendo 16% de proteína bruta. Alguns autores relataram que animais mantidos em condições nutricionais adequadas apresentam uma resposta melhor às infecções parasitárias, com contagem baixa de OPG e maior produção de anticorpos, causando redução nos índices de sobrevivência ou fecundidade desses parasitas. (HAILE *et al.*, 2002; AMARANTE, 2004; STRAIN; STEAR, 2001; KYRIAZAKIS; HOUDIJK, 2006).

5.3 FAMACHA©

Na Figura 10 são apresentadas as médias referentes ao grau FMC de cada grupo experimental no 7º dia pós-tratamento de cada mês. Não houve efeito de tratamento ($P=0,76$) sobre o grau FAMACHA©, no entanto houve efeito do período ($P<0,0001$) e da interação tratamento x período ($P<0,0001$) sobre essa variável.

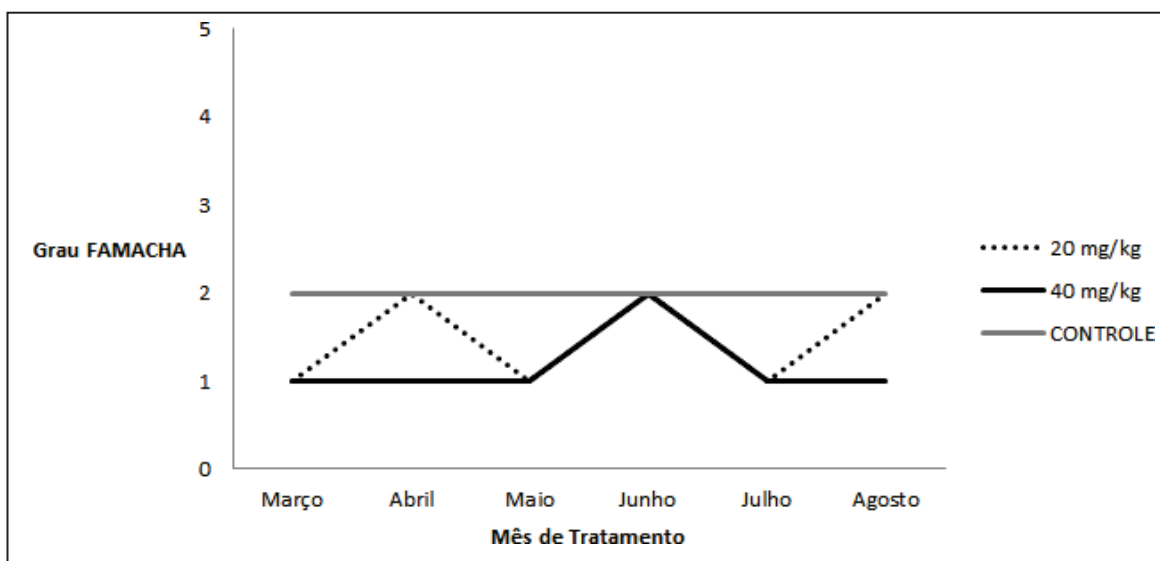


FIGURA 10 - MÉDIA DE GRAU FAMACHA® EM OVINOS NO 7º DIA PÓS-TRATAMENTO DE CADA MÊS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

Os valores de grau FMC para as ovelhas permaneceram adequados no decorrer do período experimental, variando entre os graus satisfatórios 1 e 2. As médias de hematócrito foram 27, 29 e 32%, respectivamente, para os grupos Controle, G2 e G3.

Segundo Van Wyk *et al.* (2001) os valores do VG equivalentes aos graus FAMACHA® são: >28%: grau 1; de 23 a 27%: grau 2; de 18 a 22%: grau 3; de 13 a 17%: grau 4; e <de 12%: grau 5. Portanto, as ovelhas mantiveram o hematócrito (27 a 32%) dentro os valores equivalentes ao FMC 1 e 2.

Wallace *et al.* (1999) afirmam que fatores como o período em que o animal permanece exposto à infecção parasitária e o estado nutricional dos animais pode contribuir para o nível da infecção parasitária, influenciando assim o grau FMC destes. Por outro lado, é importante avaliar que um quadro de anemia além de ter como causa a infecção por *H. contortus*, pode também ser causado pelas respostas das características individuais dos animais, por uma baixa condição nutricional e por doenças como a fasciolose ou cisticercose. Assim como a vermelhidão intensa na mucosa ocular pode ter como causa irritação, febre ou calor excessivo (VAN WYK *et al.*, 2001).

5.4 VALORES DE OPG

Na Figura 11 são apresentados os dados referentes às médias das contagens de OPG por grupo, no dia 7 pós-tratamento de cada mês de avaliação. É possível verificar que não houve efeito de tratamento ($P>0,05$) sobre o número de OPG nas fezes das ovelhas, independente da dose de vermífugo que os indivíduos receberam, sendo este também um possível indício de resistência parasitária ao MNT.

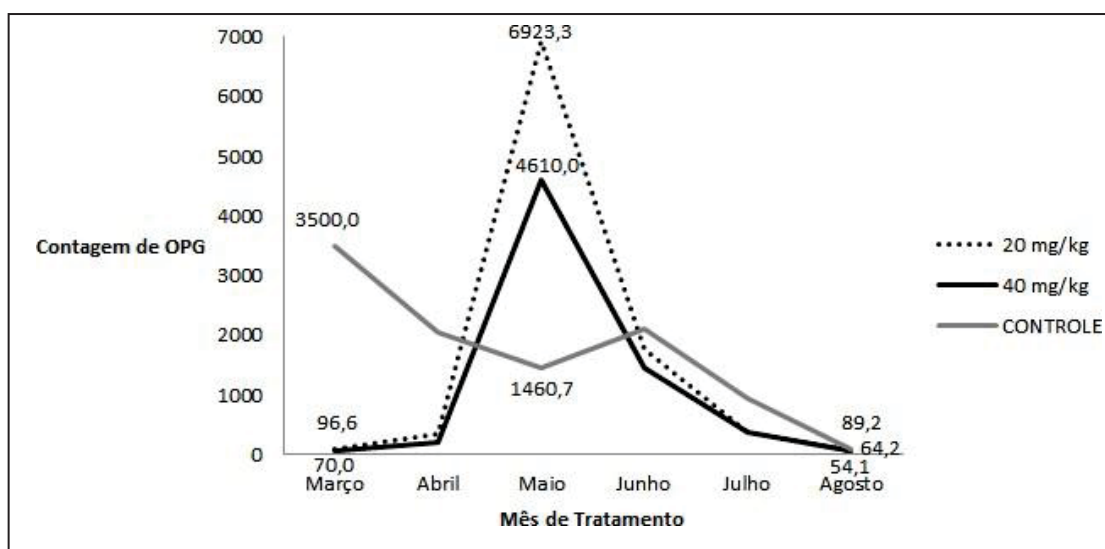


FIGURA 11 - MÉDIA DE OPG EM OVINOS NO 7º DIA PÓS-TRATAMENTO DE CADA MÊS, PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

Segundo Macedo *et al.* (2015), a alta prevalência de *H. contortus* na produção de ovinos quando associada aos sinais clínicos que indicam anemia, possivelmente podem indicar aumento da contagem de OPG, correlacionado com a diminuição do hematócrito. Outros autores também indicaram haver correlação negativa entre contagem de OPG e hematócrito (KAPLAN *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004). No presente estudo quando avaliadas ovelhas do grupo Controle, a presença de sinais clínicos indicando anemia coincidiram com o aumento da contagem de OPG e diminuição do hematócrito sendo necessário o tratamento desses animais com MNT, como indicado em caso de grau FMC ≥ 3 .

A ocorrência do maior número de OPG (maio/2017) coincide também com os maiores valores de recuperação de larvas infectantes na pastagem (Figura 14). O pastejo rotacionado por cerca de 90 dias na mesma área experimental proporcionou

alta infestação parasitária na pastagem e consequente aumento na contagem de OPG nas fezes dos animais.

Os resultados obtidos durante o mês de Maio (Figura 13) mostram a alta OPG nos grupos que receberam o MNT (G2 e G3). No entanto, a média do grau FMC para os animais desses grupos foi 1 (Figura 12), evidenciando assim possível quadro de resiliência a parasitoses, conforme descrito por Castells (2002), que é definida como a capacidade do animal de manter bons níveis de produção, apesar da infecção parasitária. Segundo Molento et al. (2004), mesmo que alguns animais apresentem alta contagem de OPG, os índices produtivos podem ser mantidos, atestando assim a resiliência nesses indivíduos que suportariam altas cargas parasitárias sem apresentar quadros de anemia.

De acordo com esses resultados é possível notar que os métodos de OPG e FMC não permitem, de maneira isolada, a caracterização de animais quanto à sensibilidade, resistência ou resiliência ao *H. contortus*. Portanto, caso haja a associação entre OPG e hematócrito é possível usar essa associação entre os resultados das técnicas para classificar os animais em sensíveis e resilientes, considerando a possibilidade de haver uma alta carga parasitária e baixa perda sanguínea (SOTOMAIOR *et al.*, 2007; GREER; SYKES, 2012).

5.5. CONTAGEM DE LARVAS INFECTANTES (L3) NA PASTAGEM

Na Figura 12 são apresentados os dados obtidos com a contagem de larvas infectantes (L3) na pastagem, nos seis meses de experimento nos diferentes piquetes, nos quais os três grupos experimentais estavam alocados. As condições meteorológicas durante o período experimental são apresentadas na Figura 13.

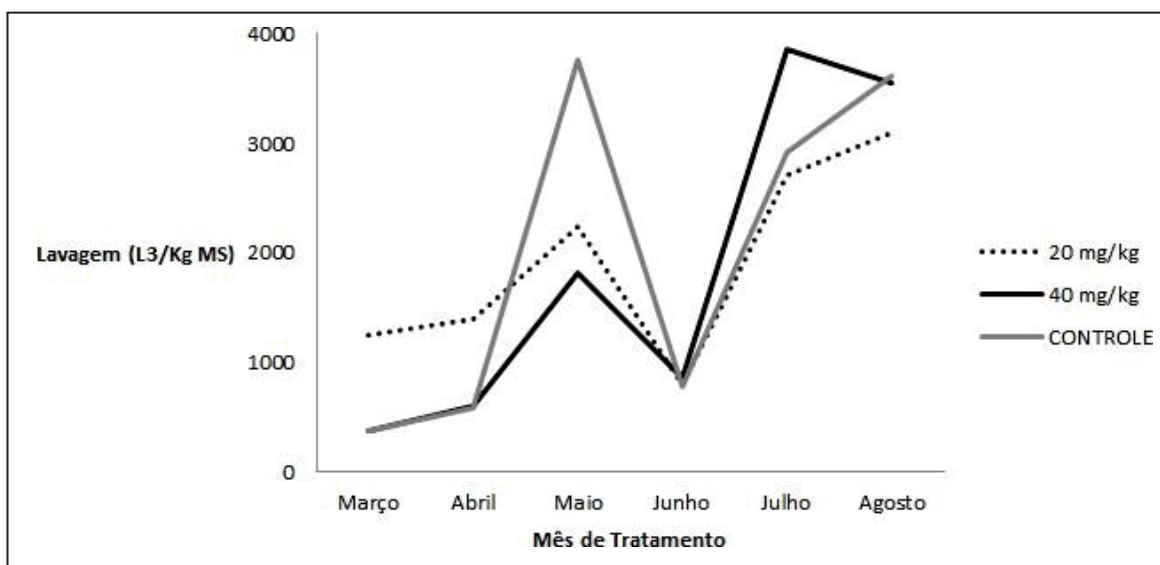


FIGURA 12 - NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES (L3) RECUPERADAS NOS MESES DE AVALIAÇÕES NOS DIFERENTES PIQUETES EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

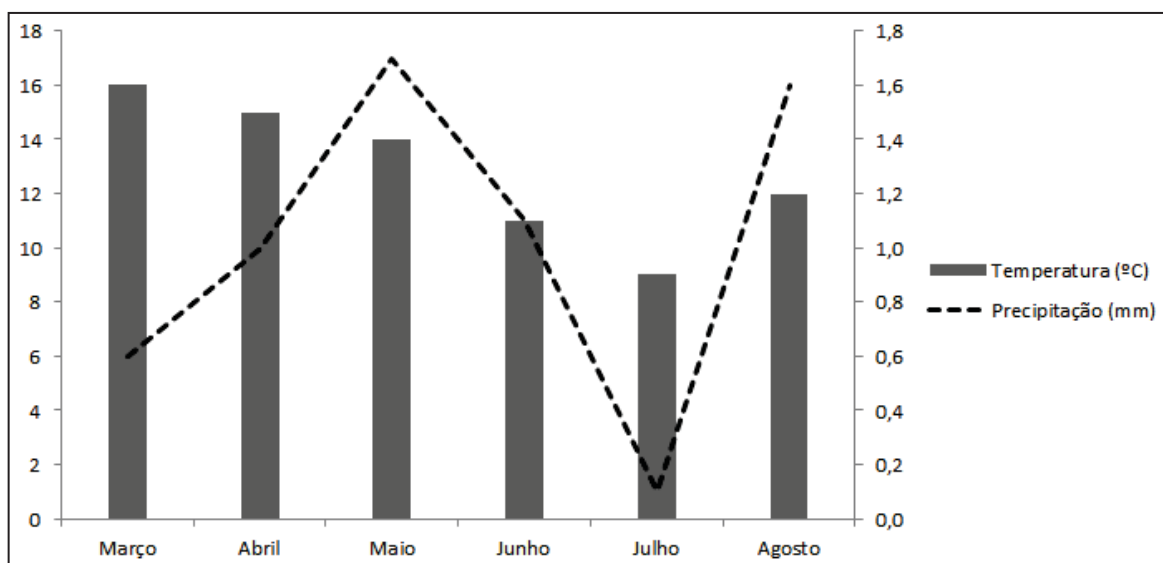


FIGURA 13 – TEMPERATURA (°C) E PLUVIOSIDADE MÉDIA DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL

FONTE: INMET (2017)

Não houve efeito de tratamento ($P = 0,9660$) sobre a contagem de L3/kg MS na pastagem. Dessa forma, o efeito de diferentes doses de vermífugo proporcionou valores similares de L3/kg MS na pastagem ao final dos seis meses de avaliações, independente da aplicação do vermífugo nos animais e da dose de supressão administrada em curto intervalo.

Os números equivalentes às contagens ocorridas até o mês de maio mostram um aumento na recuperação de larvas na pastagem. Esse fato se deu

principalmente pelo pastejo rotacionado ter acontecido nas mesmas áreas experimentais, ocasionando assim alta taxa de infestação parasitária no pasto e consequente aumento na contagem de L3/kg MS na pastagem, bem como pelo altos índices pluviométricos e temperatura, favorecendo desta forma o ciclo de vida do parasita *H. contortus*.

Segundo Molento *et al.* (2016), pastagens com valores abaixo de 1000 L3/kg MS na pastagem são seguras para os animais, entre 1000 e 5000 L3/kg MS são moderadamente infestadas e acima de 5000 L3/kg MS indicam alta infestação.

O número de L3/kg MS na pastagem apresentou redução na avaliação do mês de junho (menor que 1000 L3/kg MS), período no qual os animais foram realocados em outra área experimental que não estava sendo pastejada anteriormente. No entanto, o número de L3/kg MS na pastagem no mês de Julho, 30 dias depois, voltou a aumentar (maior que 3000 L3/kg MS) após o início do pastejo dos animais e diminuição nos índices pluviométricos e na temperatura, indicando assim que a diminuição na contagem ocorreu devido a mudança da área experimental e não em função do aumento da eficácia do MNT.

A Tabela 1 mostra os valores médios da contagem de L3/kg MS na pastagem, da massa de forragem e altura de pastagem ao final de seis meses de experimento para os três grupos avaliados.

TABELA 1 - MÉDIA NOS SEIS MESES DE AVALIAÇÕES DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES RECUPERADAS NA PASTAGEM, ALTURA DE PASTAGEM E MASSA DE FORRAGEM PARA AVALIAÇÃO DO MONEPANTEL EM TRATAMENTO SUPRESSIVO EM OVINOS EM PASTAGENS

Tratamento	L3/kg MS	Altura do Pasto (cm)	Massa de Forragem (kg MS/ha)
0	2008,08	16,59	2.883,25
1	1.915,20	15,08	2.390,33
2	1845,86	17,08	2.225,67

Os valores médios de altura indicam que a pastagem estava sendo manejada em condição próxima da favorável para o consumo de forragem por ovinos. O estudos de Amaral *et al.* (2013) sugere, para máxima ingestão instantânea de forragem, a altura média próxima de 18 cm em azevém anual.

Considerando que as ovelhas recebiam suplementação correspondente a 1% de seu peso corporal médio por dia, em função de seu período gestacional e de lactação, as exigências nutricionais foram atendidas.

A correlação entre número de larvas (L3) e massa de forragem foi negativa e não significativa ($r = -0,34$; $P=0,16$). A correlação entre número de L3/kg MS e altura

de pastagem foi positiva, mas não significativa ($r = 0,18$; $P=0,48$). Diante dessas correlações não significativas, nada se pode inferir sobre a relação entre essas características da pastagem e a presença de larvas infectantes.

De acordo com Pegoraro *et al.* (2008), grande parte das larvas L3 estão dispostas na base da forrageira e essa distribuição não tende a mudar mesmo com diferentes ofertas de forragem e método de pastoreio.

Segundo Dittrich *et al.* (2004) e Gazda *et al.* (2009), o estrato inferior da planta concentra a maior quantidade de larvas. Esses autores também encontraram diferenças no números de larvas recuperadas nas forrageiras tropicais e temperadas.

No estudo com diferentes pastagens de verão foram encontrados valores semelhantes de larvas de parasitas para pensacola (*Paspalum sauræ*) e aruana (*Panicum maximum*). Entretanto, houve maior contaminação de larvas na pastagem onde a oferta de forragem era menor quando estudadas as duas espécies forrageiras (Gazda *et al.*, 2009).

Gazda *et al.* (2012) avaliando número de larvas de parasitas em pastagens de aveia e azevém, encontraram quantidade semelhante de larvas em pastagem de aveia nos estratos superior e inferior quando 5% de oferta de forragem. Para avaliação de aveia com 12% de oferta e azevém com 10 e 20% de oferta, o valor de L3/kg MS foi menor no estrato superior em relação ao inferior.

No presente estudo foi visto que as massas e as alturas não influenciaram no número de larvas infectantes recuperadas na pastagem.

6 CONCLUSÕES

A redução significativa na eficácia após o uso do monepantel em diferentes doses por 6 meses condiz com o quadro de resistência parasitária ao fármaco, em pouco tempo de utilização. Portanto, é importante incrementar o emprego de ações integradas de manejo que visem diminuir o uso de medicamentos de forma indiscriminada, com o objetivo de retardar a resistência dos parasitas aos medicamentos nos rebanhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 791-818, 2003.

ALMEIDA, T. V. S. Avaliação da eficácia anti-helmíntica do monepantel em um rebanho de ovinos do município de Formiga – MG. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Medicina Veterinária) – Centro Universitário de Formiga – UNIFOR-MG, Formiga, 2016.

AMARAL, M.F.; MEZZALIRA, J.C.; BREMM, C. Sward structure management for a maximum short-term intake rate in annual ryegrass. **Grass Forage Sci.**, v.68, p.271–277. 2013.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance Santa Inês, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*. v. 120. p. 91- 106. 2004.

AMARANTE, A. F. T.; SALES, R. de O. Controle de Endoparasitoses dos Ovinos: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 01. n. 02, p. 14-36, 2007.

BARTHRAM, G.T. Experimental techniques: the HFRO sward stick. Penicuik: **Hill Farming Research Organization**, 1986. p.29-30. (Biennial Report 1984-1985).

BIANCHIN, I.; *et al.* **Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil**. Campo Grande: EMBRAPA, 1993. 120p. (Circular Técnica, 24).

BLACKHALL, W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectinand moxidectin-selected strains. **Experimental Parasitology**, v. 190, p. 42-48, 1998.

BUSTAMANTE, M.; *et al.* The efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile

derivative, against gastrointestinal nematodes of sheep in three countries of southern Latin America. **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p. 139-144, 2009.

CARVALHO, P. C. de F. Manejando pastagens para ovinos. In: PEREIRA NETO, O. A.; MÓRLAN, J. B.; CARVALHO, P. C. de F. (Eds.) *Práticas em ovinocultura – ferramentas para o sucesso*. Porto Alegre: SENAR, p. 15-28, 2004.

CASTELLS, D. Métodos alternativos para el control de endoparasitoses: Uso de huéspedes resistentes. In: REUNION DE ESPECIALISTAS EM PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DE ARGENTINA, BRASIL, CHILE, PARAGUAY E URUGUAY, 2002, Tandil: Faculdade de Ciências Veterinárias, 2002.

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**. v. 38, n.7, p. 2083-2091, 2008.

CEZAR, A. S.; *et al.* Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 173, p. 157-160, 2010.

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; FERNANDES, L. B.; MACHADO, R.; ESTEVES, S. N.; SALES, R. L.; JUNIOR, W. B. **Ovinocultura: controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste**. Documentos, 65. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 2008.

CHAGAS, A. C. S.; DOMINGUES, L. F.; GAÍNZA, Y. A. **Cartilha de vermifugação de ovinos e caprinos**. Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2013.

CINTRA, M. C. R.; *et al.* Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 4-6, 2016.

COLES, G. C.; *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v.136, p.167-185, 2006.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.65-71, 2011.

CRAVEN, J.; *et al.* Nansen, P. A comparison of in vitro tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, v.85, n. 1, p.49-59, 1999.

DEMELE, J.; KUTTLER, U.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 61- 70, 2010.

DEMELE, J.; KLEINSCHMIDT, N.; KÜTTLER, U. et al. Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Veterinary Parasitology**. v. 61, p. 614-618, 2012.

DITTRICH, J. R.; GAZDA, T. L.; PIAZZETTA, R. G.; OIKAWA, M. G.; RODRIGUES, C. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Localização de Larvas L3 de helmintos gastrintestinais de ovinos nas plantas forrageiras: Efeito da espécie vegetal e altura. **Archives of Veterinary Science**. v.6, n.2, p.43-48, 2004.

DOBSON, R. J.; *et al.* Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 79–92, 2012.

DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A.; VÁRADY, M. Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? *Parasitology Research*. V. 111, p. 2201-2204, 2012.

EMA. Monepantel. European Medicines Agency. 2017. Disponível em: http://ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000154/WC500068905.pdf

FORBES, A. B.; CUTLER, K. L.; RICE, B. J. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.339-344, 2002.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391-1402, 2013.

GAZDA, T. L.; PIAZZETTA, R. G.; DITTRICH, J. R.; MONTEIRO, A. L. G.; SOCCOL, V. T. Distribution of nematode larvae of sheep in tropical pasture plants. **Small Ruminant Research**, v. 82, p. 94-98, 2009.

GAZDA, T.L. *et al.* Distribuição de larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos em pastagens de inverno. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.13, p.85-92, 2012.

GHISI, M.; KAMINSKI, R.; MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 313-320, 2007.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Council of Science and Industry Research**, Australia, v.12, n.1., p. 50-52, 1939.

GREER, A.; SYKES, A. Are faecal egg counts approaching their “sell-by” date? In: **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.72, p.199-204, 2012.

HAILE, A.; TEMBELY, S.; ANINDO, D. O.; MUKASA-MUGERWA, E.; REGE, J. E. O.; ALEMU YAMI, R. L.; BAKER, R. L.. Effects of breed and dietary protein supplementation on the responses to gastrointestinal nematode infections in ethiopian sheep. **Small Ruminant Research**, v. 44, p. 247-261, 2002.

HOSTE, H. *et al.* Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 239–351, 2016.

Instituto Nacional de Meteorologia – INMET Estações Automáticas: Disponível em: http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf. 2017

Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR Cartas Climáticas: Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677>. 2018

JACKSON, F.; VARADY, M.; BARTLEY, D.J. Managing anthelmintic resistance in goats: can we learn lesson from sheep? **Small Ruminant Research**, v.103, p.3-9, 2012.

JAMES, C. E.; HUDSON, A. L.; DAVEY, M. W.; Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 328–335, 2009.

JEFFERIES, B. C. Body condition scoring and its use in management. **Tasmanian Journal Agricultural**, v. 32, p. 19-21, 1961.

KAMINSKY, R.; *et al.* Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multiresistent nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v.109, p.19–23, 2011.

KAMINSKY, R.; *et al.* A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, v.452, p.176–180, 2008b. KAMINSKY, R.; *et al.* A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v.452, p.176–180, 2008b.

KAMINSKY, R.; *et al.* Identification of the amino- acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v.103, p.931–939, 2008a.

KAPLAN, R. M.; *et al.* Validation of the FAMACHA© eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**. 2004.

KENYON, F.; GREER, A. W.; COLES, G. C.; CRINGOLI, G.; PAPADOPOULOS, E.; CABARET, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J. A.; THOMAS, E.; VERCRUYSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, in press, doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.015, 2009.

KRYCHAK-FURTADO, S.; *et al.* Efeito de *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Musa paradisiaca* (Musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de nematoides gastrintestinais de ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 191- 197, 2005.

KYRIAZAKIS, I.; HOUDIJK, J. Immunonutrition: nutritional control of parasites. **Small Ruminant Research**, v. 62, p. 79-82, 2006.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 105-111. 1988.

LANUSSE, C. E.; BALLENT, M.; LIFSCHITZ, A. Modulation of cellular drug efflux: impact on antiparasitic therapy. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15., 2., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008.

LITTLE, P. R.; *et al.* Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel- abamectin, in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, n. 3, p. 121-129, 2010.

McCAVERA S, WALSH TK, WOLSTENHOLME AJ. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**. 134, 1111-1121. 2007

MACEDO, F. A. F.; *et al.* Parasitose gastrointestinal e valor do hematócrito em fêmeas ovinas alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 13, n. 2, p. 65-73, 2015.

MARTIN, R. J.; *et al.* Levamisole receptors: a second awakening. **Trends in Parasitology**, v. 28, p. 289-296, 2012.

MARTINS, A. C. **Estudo de resistência anti-helmíntica ao monepantel em propriedades de ovinos de uma microrregião em torno de Jaboticabal - SP.** 2016. 61p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.

MCKELLAR, Q. A.; JACKSON, F. Veterinary Anthelmintics: old and new. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 10, p. 456-461, 2004.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, v.7, p.598, 2014.

MILLER, C. M.; WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M. How repeatable is a faecal egg count reduction test? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, p. 323-328,

2006.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, p.1469-1477, 2005.

MOLENTO, M. B.; Buzatti, A.; Sprenger, L. K. Pasture larval count as a supporting method for parasite epidemiology, population dynamic and control in ruminants. **Livestock Science**, v. 192, p. 48–54, 2008.

MOLENTO M.B., TASCA C., FERREIRA M., BONONI R. & STECCA E. 2004. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Ciencia Rural* 34: 1139-1145.

MOTTIER, M. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenet Genomics**, v. 18, p. 129-140, 2008.

PEGORARO, E. J.; *et al.* Manejo da pastagem de azevém, contaminação larval no pasto e infecção parasitária em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1397-1403, 2008.

PRICHARD R. K., HALL C. A., KELLY J. D., MARTIN I. C. A. & DONALD A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**. 56: 239-25, 1. 1980.

PRICHARD, R. K. Mechanisms of anthelmintic resistance: Implications for the future of parasite control. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15., 2., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008.

RAMOS, F. **Resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrointestinais de ruminantes naturalmente infectados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

ROBERTS, F. H. S.; O’SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for *Strongyles* infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

ROBERTSON, A.P.; BJORN, H.E.; MARTIN, R.J. Resistance to lavamisole resolved at the single-channel level. **FASEB Journal**, v. 13, p. 749-760, 1999.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, v.55, n.1-3 p.65-75, 2004.

ROSALINSKI-MORAES, F.; *et al.* Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (Amai), oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 559-565, 2007.

RUFENER, L.; *et al.* *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 4, 2009.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 3-17, 2016.

SAMSON-HILMMELSTJERNA, G.; *et al.* Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. **Parasitology**, v. 134, p. 1077-1086, 2007.

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; *et al.* Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, v. 105, p. 825-834, 2009.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT® 14.1 User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2015.

SCOTT, I.; *et al.* Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.166–171, 2013.

SOTOMAIOR, C. S.; *et al.* Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Revista Acadêmica**. v.5, n.4, p.397-412, 2007

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2014. p. 501-530.

STAFFORD, K.; COLES, G.C. Nematode control practices and anthelmintic resistance in dairy calves in the south west of England. **Veterinary Record**, v. 144, n. 24, p. 659-661, 1999.

STRAIN, S. A. J.; STEAR, M. J. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, Oxford, v.23, p.527-531, 2001

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 183-194, 2002.

TORRES, S. E. F. A. **Recuperação de larvas infectantes (L3) em sistemas de pastejo de ovinos isolado, combinado e alternado com bovinos, no período das águas**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

VAN DEN BROM, R.; *et al.* *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 278–280, 2015.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? In: WORKSHOP OF MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 1997, Sun City, South Africa. Proceedings... Sun City, 1997. p.51-63.

VAN WYK, J. A. Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.68, p.55-67, 2001.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, Série Documentos/Embrapa Caprinos, n. 58, 2005. 32 p.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, p.28-31, 2008.

WALLACE, D. S.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L. ; ECKERSALL, J. L.; FISHWICK, G.; HOLMES, P. H.; MCKELLAR, Q. A.; MITCHELL, S.; MURRAY, M.; PARKINS, J. J.; STEAR, M. J. The influence of increased feeding on the susceptibility of sheep to infection with *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 457-463, 1999.

WALLER, P. J. Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. In: FAO. Animal production and health division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. **Final proceedings of FAO Technical Co-operation Project in Malaysia TCP/MAL/0065 (T)** Rome, Italy: FAO, 2002. 5-18p.

WOLSTENHOLME, A. J.; *et al.* Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends in Parasitology**, v.20, p.469-476, 2004.

XU, M. *et al.* Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of Pglycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.91, n.2, p. 327-335, 1998.

YEATES, G. W.*et al.* Impact on soil fauna of sheep faeces containing a range of parasite control agents. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 180-389, 2007.

ANEXOS

ANEXO	1	-	PROCEDIMENTOS	PARA	A	LAVAGEM	DE
PASTO							
							60

ANEXO 1 - PROCEDIMENTOS PARA A LAVAGEM DE PASTO

1. Colocar e submergir entre 0,5 a 1,0 kg de pasto em recipiente plástico contendo 5 a 7 litros de água e 10 mL de detergente não iônico. Lavar o saco plástico onde estavam as amostras e adicionar a solução ao recipiente.

2. Lavar o material em água natural durante 5h. Durante este período, deve-se agitar moderadamente o material a cada 30 minutos por 3 minutos, separando as fibras e retornando-as para o meio. Este procedimento tem o objetivo de auxiliar na separação das larvas.

3. Feito isto, retira-se o pasto em pequenas quantidades, sob peneira em cima do recipiente.

4. Logo após, deve-se passar todo material por peneira de 1mm (peneira plástica simples) para remover partículas grandes, colocando a solução em novo recipiente. Após isto, deve-se passar o material por peneira de 38 µm onde então serão retidas as larvas. Pode-se adaptar uma peneira abaixo da outra, visando economizar tempo.

5. Lavar com jato moderado a peneira logo acima de frascos/copos cônicos. Deixar o material em decantação por 3 h.

6. Descarta-se o sobrenadante dos frascos cônicos, ajustando o volume final para 50 mL.

7. Imediatamente após, adicionar 1 mL de solução iodada a 10% na solução contendo as larvas.

8. Após 30 minutos deve-se adicionar 0,5 mL de tiosulfeto de sódio a 12% para descolorir os parasitas de vida livre.

9. Agitar a amostra e retirar três alíquotas de 0,5 mL para contagem e identificação do gênero das larvas sob aumento de 10 e 40x.

10. Independentemente, uma amostra de pasto (100 g) deve ser secada em estufa para determinação da matéria seca (MS).

Depois de convertida a média da alíquota para o volume total (50 mL), o resultado deve ser expresso em: L3/kg MS (matéria seca) = No. de larvas contadas e peso do pasto inicial/gramas (regra de três)

Valores acima de 1.000 L3/kg MS de *Trichostrongilídeos*: pastagem moderadamente infectado. Valores acima de 5.000 L3/kg/MS: indicativo de infecção clínica em animais jovens.